APAT
Agenzia per la protezione
dell'ambiente e per i servizi tecnici

IRSA-CNR
Istituto di Ricerca sulle Acque
Consiglio Nazionale delle Ricerche

Metodi analitici per le acque

Volume Primo

Sezione 1000 - Parte generale
Sezione 2000 - Parametri chimico-fisici
Sezione 3000 - Metalli

APAT
Manuali e Linee Guida 29/2003

Informazioni legali
L'Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici (**APAT**) o le persone che agiscono per suo conto non sono responsabili dell'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questo manuale.

APAT - Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici
Via Vitaliano Brancati, 48 - 00144 Roma
www.apat.it

CNR-IRSA - Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto di Ricerca sulle Acque
Via Reno, 1 - 00195 Roma
www.irsa.rm.cnr.it

© APAT, Rapporti 29/2003

ISBN 88-448-0083-7

Riproduzione autorizzata citando la fonte

Elaborazione grafica
APAT

Grafica di copertina: Franco Iozzoli

Foto: Paolo Orlandi

Coordinamento tipografico
APAT

Impaginazione e stampa
I.G.E.R. srl - Viale C.T. Odescalchi, 67/A - 00147 Roma

Stampato su carta TCF

Finito di stampare febbraio 2004

Il manuale "Metodi Analitici per le Acque" è pubblicato nella serie editoriale "Manuali e Linee Guida" dell'Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per i Servizi Tecnici (APAT).

L'opera si articola in tre volumi, suddivisi in sezioni (da 1000 a 9040). Fatta eccezione per la parte generale (sezioni 1000-1040), ogni sezione contiene uno o più metodi, costituiti da capitoli, paragrafi e sottoparagrafi.

I metodi analitici riportati nel manuale sono stati elaborati da una Commissione istituita nel 1996 dall'Istituto di Ricerca sulle Acque del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IRSA-CNR), per l'aggiornamento e l'ampliamento dei metodi riportati nel Quaderno 100 "Metodi analitici per le acque", pubblicato dall'IRSA-CNR ed edito dal Poligrafico dello Stato nel 1994.

Un Gruppo di Lavoro, coordinato dall'APAT, e formato dal Servizio di Metrologia Ambientale dell'APAT, dall'Istituto di Ricerca sulle Acque del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IRSA-CNR), dalle Agenzie Regionali per la Protezione dell'Ambiente (ARPA) e dalle Agenzie Provinciali per la Protezione dell'Ambiente (APPA), con il contributo del Centro Tematico Nazionale "Acque interne e marino costiere" (CTN/AIM), ha provveduto ad una revisione critica e ad una integrazione dei metodi analitici prodotti dalla Commissione istituita dall'IRSA-CNR.

I metodi analitici riportati nel presente manuale possono essere riprodotti ed utilizzati purché ne sia citata la fonte.

L'edizione finale è a cura di:
Maria Belli, Damiano Centioli, Paolo de Zorzi, Umberto Sansone
(Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici - APAT)
Silvio Capri, Romano Pagnotta, Maurizio Pettine
(Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto di Ricerca sulle Acque - CNR-IRSA)

Indice

VOLUME 1

PRESENTAZIONE

PREMESSA

1000 - PARTE GENERALE
1010 - Strutture, attrezzature e reattivi di laboratorio 5
1020 - Lineamenti di tecniche analitiche 25
1030 - Metodi di campionamento 75
1040 - Qualità del dato analitico 87

2000 PARAMETRI FISICI, CHIMICI E CHIMICO-FISICI
2010 - Acidità e alcalinità (Acidità: titrimetrico; Alcalinità: potenziometrico e titrimetrico) 115
2020 - Colore (qualitativo; spettrofotometrico; metodo al platino-cobalto) 123
2030 - Conducibilità 131
2040 - Durezza (per calcolo; complessometrico con EDTA) 137
2050 - Odore 141
2060 - pH 145
2070 - Salinità 153
2080 - Sapore 157
2090 - Solidi (totali disciolti; totali sospesi; sedimentabili; fissi e volatili a 600°C) 161
2100 - Temperatura 171
2110 - Torbidità 177
2120 - Trasparenza 183

3000 - METALLI E SPECIE METALLICHE
3010 - Trattamento preliminare dei campioni per l'analisi dei metalli mediante mineralizzazione acida 189
3020 - Determinazione di elementi chimici mediante spettroscopia di emissione con sorgente al plasma (ICP-OES) 197
3030 - Determinazione di cationi (sodio, ammonio, potassio, magnesio, calcio) mediante cromatografia ionica 215
3040 - Metodi di preconcentrazione per la determinazione di metalli in tracce 225
3050 - Alluminio (F-AAS; ETA-AAS; spettrofotometrico con eriocromocianina R) 237
3060 - Antimonio (ETA-AAS; HG-AAS) 251
3070 - Argento (ETA-AAS; APDC+ETA-AAS) 263
3080 - Arsenico (HG-AAS; spettrofotometrico con dietilditiocarbammato di argento) 271
3090 - Bario (F-AAS; ETA-AAS) 283
3100 - Berillio (ETA-AAS) 291
3110 - Boro (spettrofotometrico con curcumina; spettrofotometrico con carminio) 297
3120 - Cadmio (F-AAS; ETA-AAS) 303
3130 - Calcio (F-AAS) 311
3140 - Cobalto (ETA-AAS) 315

3150 - Cromo (Cromo totale: F-AAS; ETA-AAS; Cromo VI: APDC+ETA-AAS; Cromo III: ETA-AAS dopo eliminazione di Cromo VI; Cromo totale: coprecipitazione con Fe $(OH)_3$+ETA-AAS; Cromo VI: spettrofotometrico con difenilcarbazide) 321
3160 - Ferro (F-AAS; ETA-AAS) 345
3170 - Litio (F-AAS) 355
3180 - Magnesio (F-AAS) 359
3190 - Manganese (F-AAS; ETA-AAS) 363
3200 - Mercurio (ossidazione con $KMnO_4$+CV-AAS; ossidazione con HNO_3 mediante microonde +CV-AAS; ossidazione con HNO_3 mediante microonde +CV-AAS e amalgama su oro) 373
3210 - Molibdeno (ETA-AAS) 391
3220 - Nichel (F-AAS; ETA-AAS) 397
3230 - Piombo (F-AAS; ETA-AAS; spettrofotometrico con ditizone) 405
3240 - Potassio (F-AAS) 419
3250 - Rame (F-AAS; ETA-AAS; spettrofotometrico con ossalildiidrazide) 423
3260 - Selenio (HG-AAS; spettrofotometrico con o-fenilendiammina) 435
3270 - Sodio (F-AAS) 445
3280 - Stagno (F-AAS; ETA-AAS; spettrofotometrico con violetto di catechina) 449
3290 - Tallio (ETA-AAS; APDC+ETA-AAS) 461
3300 - Tellurio (ETA-AAS) 471
3310 - Vanadio (ETA-AAS; coprecipitazione con $Fe(OH)_3$+ETA-AAS) 477
3320 - Zinco (F-AAS) 487

VOLUME 2

4000 - COSTITUENTI INORGANICI NON METALLICI
4010 - Anidride carbonica 495
4020 - Anioni (fluoruro, cloruro, nitrito, bromuro, nitrato, fosfato e solfato) in cromatografia ionica 499
4030 - Azoto ammoniacale (spettrofotometrico all'indofenolo; spettrofotometrico con reattivo di Nessler; potenziometrico; spettrofotometrico o titrimetrico, previa distillazione) 509
4040 - Azoto nitrico (spettrofotometrico mediante salicilato di sodio; spettrofotometrico con NEDA) 525
4050 - Azoto nitroso 533
4060 - Azoto totale e fosforo totale 537
4070 - Cianuro 541
4080 - Cloro attivo libero 547
4090 - Cloruro (titolazione argentometrica, mercurimetrica e potenziometrica) 553
4100 - Fluoruro (spettrofotometrico; potenziometrico) 565
4110 - Fosforo (ortofosfato; fosforo totale) 575
4120 - Ossigeno disciolto (titolazione iodometrica; titolazione potenziometrica) 583
4130 - Silice 595
4140 - Solfato (gravimetrico; torbidimetrico) 599
4150 - Solfito (titolazione iodometrica; metodo cromatografico) 605
4160 - Solfuro 613

5000 - COSTITUENTI ORGANICI
5010 - Aldeidi (composti carbonilici) (spettrofotometrico con MBTH; derivatizzazione + SPE+HPLC-UV; derivatizzazione + LLE+GC-ECD) 621
5020 - Ammine alifatiche (GC-AFD) 635
5030 - Azoto organico 641
5040 - Carbonio organico disciolto 645

5050 - Diserbanti ureici (LLE o SPE+HPLC-UV) 653
5060 - Prodotti fitosanitari (antiparassitari, pesticidi) (LLE o SPE+GC-NPD o HPLC-UV o GC-MS) 661
5070 - Fenoli (spettrofotometrico con 4-amminoantipirina previa estrazione; spettrofotometrico diretto con 4-amminoantipirina; LLE o SPE+HPLC-UV) 679
5080 - Idrocarburi policiclici aromatici (LLE o SPE+GC-MS; LLE o SPE+HPLC-UV o HPLC-fluorescenza) 697
5090 - Pesticidi clorurati (LLE+GC-ECD) 707
5100 - Pesticidi fosforati (LLE+GC-FPD) 723
5110 - Policlorobifenili e policloroterfenili (LLE+GC-MS o GC-ECD) 743
5120 - Richiesta biochimica di ossigeno (BOD_5) 767
5130 - Richiesta chimica di ossigeno (COD) 781
5140 - Solventi organici aromatici (spazio di testa statico +GC-FID; spazio di testa dinamico+GC-FID) 789
5150 - Solventi clorurati (spazio di testa statico+GC-ECD; spazio di testa dinamico+GC-ECD) 799
5160 - Sostanze oleose (grassi e oli animali e vegetali; idrocarburi totali) (gravimetrico; IR) 811
5170 - Tensioattivi anionici (MBAS) 827
5180 - Tensioattivi non ionici (BIAS) 833

VOLUME 3

6000 - METODI MICROBIOLOGICI - PARTE GENERALE
6010 - Modalità di campionamento 845
6020 - Lineamenti di tecniche analitiche 849
6030 - Generalità sui terreni di coltura per batteriologia 853
6040 - Attrezzature di base per le analisi microbiologiche delle acque 855

7000 - METODI PER LA DETERMINAZIONE DI MICROORGANISMI INDICATORI DI INQUINAMENTO E DI PATOGENI
7010 - Coliformi totali 865
7020 - Coliformi fecali 875
7030 - *Escherichia coli* 883
7040 - Streptococchi fecali ed enterococchi 895
7050 - Conteggio delle colonie su agar a 36°C e 22°C 909
7060 - Spore di clostridi solfito riduttori 913
7070 - *Aeromonas spp* 921
7080 - *Salmonella spp* 927
7090 - *Vibrio spp* 935
7100 - Uova di elminti 941
7110 - Batteriofagi 945
7120 - Enterovirus 959
7130 - Oocisti di *Cryptosporidium* e cisti di *Giardia* 971

8000 - METODI ECOTOSSICOLOGICI
8010 - Metodi di valutazione della tossicità con pesci 985
8020 - Metodi di valutazione della tossicità con *Daphnia* 993
8030 - Metodo di valutazione della tossicità acuta con batteri bioluminescenti 1003
8040 - Metodo di valutazione della tossicità acuta con *Ceriodaphnia dubia* 1013
8050 - Metodo di valutazione della tossicità acuta con *Mysidopsis bahia* 1027
8060 - Metodo di valutazione della tossicità acuta con *Artemia sp.* 1043

8070 - Metodo di valutazione della tossicità acuta con *Cyprinodon variegatus* 1051
8080 - Metodo di valutazione della tossicità acuta con trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) 1065
8090 - Metodo di valutazione della tossicità cronica (7 giorni) con *Mysidopsis bahia* 1075
8100 - Metodo di valutazione della tossicità cronica (7 giorni) con *Ceriodaphnia dubia* 1085
8110 - Metodo di valutazione della tossicità cronica (7 giorni) con *Cyprinodon variegatus* 1091
8120 - Saggio di tossicità prolungato (14-28 giorni) con trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) (metodo preliminare) 1099
8130 - Analisi statistica dei risultati di saggi cronici 1109

9000 - INDICATORI BIOLOGICI
9010 - Indice biotico esteso (I.B.E.) 1115
9020 Determinazione della clorofilla: metodo spettrofotometrico 1137
9030 Determinazione dell'adenosintrifosfato (ATP) 1143
9040 Conta diretta dell'abbondanza microbica (DAPI) 1149

Presentazione

Questa nuova edizione del manuale "Metodi Analitici per le Acque" rappresenta il coronamento di un'attività avviata nel 1996 con l'obiettivo di assicurare, in analogia con quanto accade in altri paesi ad elevata sensibilità ambientale, una revisione periodica delle metodologie analitiche per la caratterizzazione fisica, chimica, biologica e microbiologica delle acque.

Riprendendo una formula già collaudata con successo in passato, l'attività di armonizzazione dei metodi è stata coordinata da una Commissione istituita nel 1996 dall'Istituto di Ricerca sulle Acque del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IRSA-CNR), composta da rappresentanti istituzionali di soggetti pubblici (Università, Istituto Superiore di Sanità, ENEA, Conferenza Stato-Regioni, Ministero per le Politiche Agricole, Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio, UICI, CISBA), nonché da esperti rappresentanti di settori industriali (ENEL, Confindustria), interessati alle problematiche relative al controllo e alla salvaguardia dei corpi idrici.

La Commissione ha individuato otto aree di intervento (Campionamento, Qualità del dato analitico, Cromatografia ionica, Metalli, Microinquinanti organici, Metodi microbiologici, Metodi tossicologici e Metodi biologici) e ha dato vita ai relativi gruppi di lavoro, potenziati attraverso il concorso di laboratori appartenenti ad enti diversi da quelli inseriti nella Commissione, con il compito di validare le procedure analitiche in esame.

L'emanazione del Decreto Legislativo 152/99, intervenuta nella fase terminale delle attività dei suddetti gruppi di lavoro, ha modificato sostanzialmente il quadro normativo di riferimento, non solo per quanto concerne le responsabilità istituzionali, con il trasferimento all'Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per i Servizi Tecnici (APAT) dei compiti di aggiornamento delle metodologie di campionamento ed analisi delle matrici ambientali, ma anche in merito agli indici da prendere in considerazione nell'ambito delle attività previste dal decreto in questione (controllo dei limiti di emissione degli scarichi idrici e monitoraggio e classificazione delle acque). In questo quadro l'IRSA ha messo a disposizione il proprio contributo di esperienza e cultura maturati nel settore e, nell'ambito di una convenzione stipulata con APAT, ha reso ufficialmente operativa una collaborazione che, a partire dalla pubblicazione di questo manuale, vedrà anche in futuro entrambe le istituzioni impegnate in affinamenti ed integrazioni dei metodi analitici e nell'avvio di attività atte a coprire quelle esigenze del decreto legislativo non ancora soddisfatte con la pubblicazione di questo manuale. Nell'ambito della convenzione APAT-IRSA è stato istituito un gruppo di lavoro coordinato dall'APAT e formato da rappresentanti del Servizio di Metrologia Ambientale dell'APAT, dell'IRSA-CNR, delle ARPA e delle APPA, che con il contributo del Centro Tematico Nazionale "Acque interne e marino costiere" (CTN-AIM), ha provveduto ad una revisione critica e ad una integrazione dei metodi analitici per le acque prodotti dalla Commissione IRSA-CNR.

Questo nuova edizione del manuale, "Metodi Analitici per le Acque", che viene pubblicata nella serie editoriale "Manuali e Linee Guida" dell'APAT, non è un documento esaustivo per l'applicazione del Decreto Legislativo 152/99. Il manuale riserva tuttavia, rispetto al passato, un più ampio spazio ai metodi biologici e alle procedure per la valutazione della tossicità acuta e cronica attraverso vari organismi test, venendo parzialmente incontro alle problematiche poste dall'applicazione del decreto legislativo nel settore del controllo analitico.

Le principali novità di questa edizione si possono così riassumere:

- *l'arricchimento della sezione concernente l'elaborazione e presentazione dei risultati con l'introduzione del concetto di qualità delle misure attraverso la descrizione dei relativi strumenti (carte di controllo, materiali di riferimento, studi interlaboratorio);*
- *l'inserimento di protocolli analitici basati sull'impiego di tecniche strumentali non riportate nella precedente edizione (spettroscopia di emissione in sorgente plasma, cromatografia ionica, gas cromatografia-spettrometria di massa, cromatografia liquida ad alta prestazione);*
- *potenziamento degli strumenti di indagine microbiologica delle acque attraverso la definizione dei protocolli per l'analisi di microorganismi non considerati nel manuale precedente;*
- *l'ampliamento della sezione relativa ai parametri tossicologici, con la presentazione di saggi di tipo acuto e di tipo cronico su diversi organismi test (batteri, crostacei, pesci);*
- *la descrizione della procedura per la valutazione dell'Indice Biotico Esteso, strumento indispensabile nelle azioni di monitoraggio della qualità delle acque correnti, come previsto dal Decreto Legislativo 152/99.*

Un sentito ringraziamento va a tutti coloro che hanno partecipato gratuitamente, con entusiasmo, alle attività della Commissione IRSA e dei gruppi di lavoro, e a quanti hanno permesso di apportare correttivi alle procedure analitiche già codificate.

Un particolare ringraziamento va inoltre al Gruppo di Lavoro APAT-IRSA-ARPA-APPA-CTN/AIM per l'impegno e la disponibilità offerta nella revisione critica dei metodi analitici. Il notevole lavoro ha reso possibile la predisposizione di questa nuova edizione del manuale.

Ing. Giorgio Cesari
Direttore Generale dell'APAT

Prof. Roberto Passino
Direttore dell'IRSA-CNR

Premessa

Il controllo ambientale per essere reso efficace necessita di un insieme di azioni mirate a garantire la disponibilità di un quadro aggiornato dello stato di qualità dell'ambiente e della sua evoluzione; ciò al fine di creare una base conoscitiva necessaria per le politiche ambientali e per una corretta informazione al pubblico. Il controllo ambientale è generalmente effettuato da diverse istituzioni presenti sul territorio, che possono utilizzare metodiche, protocolli di raccolta e misura di campioni ambientali tra loro diversificati.
Per garantire un quadro dello stato dell'ambiente accurato ed affidabile e poter raggiungere una confrontabilità a livello nazionale ed internazionale dei dati ottenuti con metodiche e protocolli tra loro diversi è evidente la necessità di una strategia comune per la definizione di procedure armonizzate di campionamento e di misura.
L'istituzione del sistema agenziale per la protezione dell'ambiente e l'attribuzione all'Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per i Servizi Tecnici (APAT) della funzione di indirizzo e coordinamento tecnico nei confronti delle Agenzie regionali e delle province autonome, ha contribuito a rafforzare la sensibilità nazionale per l'armonizzazione delle metodiche utilizzate a livello territoriale per le attività di monitoraggio e di controllo ambientale (campionamento, analisi, trasmissione ed elaborazione dei dati).
Il decreto legislativo n° 152 dell'11 maggio 1999 sulla tutela delle acque, che recepisce le direttive europee 91/271/CEE e 91/676/CEE attribuisce all'APAT il compito di revisione ed aggiornamento delle metodologie di campionamento e di analisi e la messa a punto di metodi per la classificazione ed il monitoraggio dei corpi idrici. In questo contesto l'APAT ha ratificato una convenzione con l'Istituto di Ricerca sulle Acque del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IRSA-CNR) che prevedeva, tra l'altro, la pubblicazione congiunta di una raccolta di metodi analitici per le acque. Nell'ambito della convenzione è stato istituito un gruppo di lavoro formato da rappresentanti del Servizio di Metrologia Ambientale dell'APAT, dell'IRSA, delle ARPA e delle APPA, che con il contributo del Centro Tematico Nazionale "Acque interne e marino costiere" (CTN/AIM), ha provveduto ad una revisione critica dei metodi analitici per le acque prodotti precedentemente da una Commissione istituita nel 1996 dall'Istituto di Ricerca sulle Acque del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IRSA-CNR), per l'aggiornamento e l'ampliamento dei metodi riportati nel Quaderno 100 "Metodi analitici per le acque", pubblicato dall'IRSA-CNR e edito dal Poligrafico dello Stato nel 1994.
La Commissione istituita dall'IRSA-CNR nel 1996 era composta da docenti universitari di chimica analitica o discipline attinenti alle problematiche ambientali, da rappresentanti degli ex Laboratori di Igiene e Profilassi o ex Presidi Multizonali di Prevenzione, ora confluiti nelle Agenzie Regionali di Protezione Ambientale, da rappresentanti di enti di ricerca ed istituzioni pubbliche e private (Centro Italiano Studi di Biologia Ambientale, Confindustria, ENEA, ENEL, Istituto Superiore di Sanità, Laboratorio Centrale di Idrobiologia del Ministero delle Risorse Agricole, Alimentari e Forestali, Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio) e da ricercatori dell'Istituto di Ricerca sulle Acque del Consiglio Nazionale delle Ricerche.
La Commissione ha operato nel periodo 1996-1999, con la creazione di gruppi di lavoro, a cui hanno partecipato laboratori selezionati sulla base delle specifiche competenze maturate per gli ambiti tematici di seguito elencati:

- campionamento;
- qualità del dato;
- cromatografia ionica;
- metalli e composti organometallici;
- microinquinanti organici;

- metodi microbiologici;
- metodi tossicologici;
- metodi biologici.

I gruppi di lavoro della Commissione IRSA-CNR riflettevano la necessità di adeguare al progresso tecnico-scientifico e alle novità in campo normativo le metodologie in uso, prevedendo sia l'impiego di tecniche strumentali avanzate per i parametri tradizionali, sia lo sviluppo di metodi per gli indici di nuova generazione.
Mentre per i primi tre ambiti tematici l'obiettivo era più circoscritto, già definito in partenza, vale a dire, la revisione delle sezioni 1030 "Campionamento" e 1040 "Elaborazione dei risultati" presenti nel Quaderno IRSA N° 100 e l'introduzione di due protocolli analitici, uno riguardante la determinazione di anioni (cloruro, nitrato, solfato, bromuro, fluoruro, fosfato e nitrito), l'altro di cationi (sodio, ammonio, potassio, magnesio e calcio) mediante cromatografia ionica, per i restanti temi è stato necessario individuare gli indici di interesse prioritario sui quali condurre la sperimentazione.
In particolare, per quanto concerne i metalli, l'attenzione si è concentrata su quei metalli per i quali non era previsto alcun protocollo analitico nel Quaderno 100 (argento, antimonio, cobalto, molibdeno e vanadio). Sono stati introdotti inoltre, metodi in assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica per gli altri metalli e un metodo multi-elementare per la determinazione di specie metalliche mediante spettroscopia di emissione con sorgente al plasma.
Tra i microinquinanti organici sono stati presi in considerazione le aldeidi, i fenoli, gli idrocarburi policiclici aromatici e i diserbanti ureici, pervenendo alla validazione di metodi analitici basati sull'impiego dell'estrazione in fase solida ed analisi in cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) e/o gascromatografia. Per i composti organici volatili, è stata definita la determinazione in gascromatografia mediante spazio di testa statico o dinamico. Viene inoltre presentato un metodo multi-residuo per l'analisi di prodotti fitosanitari nelle acque in grado di determinare più di 100 principi attivi.
Per quanto riguarda la caratterizzazione microbiologica delle acque, oltre alla revisione delle procedure per la determinazione degli indici tradizionali, sono stati redatti metodi analitici per la determinazione dei seguenti microorganismi: *Aeromonas spp.*, *Salmonella spp.*, *Vibrio spp.*, uova di elminti, enterovirus, oocisti di *Cryptosporidium* e cisti di *Giardia*.
La sezione dei metodi tossicologici risulta notevolmente ampliata con la descrizione di saggi di tipo acuto e di tipo cronico su diversi organismi test (batteri, crostacei, pesci). Questi saggi, essendo stati definiti per rispondere all'ex D.Lgs. 133/92 relativo agli scarichi industriali di sostanze pericolose, non rispondono pienamente ai requisiti imposti dal D.Lgs. 152/99, ma possono essere considerati un punto di partenza per l'avvio di attività finalizzate allo sviluppo di metodi per saggi ecotossicologici così come previsti dal decreto attualmente in vigore.
Sono state inoltre messe a punto le metodologie per la determinazione dell'indice biotico esteso (I.B.E.), della clorofilla, dell'ATP e della conta diretta dell'abbondanza microbica (DAPI).
I diversi gruppi di lavoro della Commissione IRSA-CNR hanno operato in diverse fasi:

1. ricognizione bibliografica per accertare l'esistenza di procedure armonizzate a livello nazionale e/o internazionale per la determinazione dell'analita di interesse;
2. definizione del protocollo analitico;
3. validazione attraverso test interlaboratorio su materiali certificati o soluzioni preparate in laboratorio e distribuite ai laboratori partecipanti.

Al fine di aumentare la significatività dei dati di ripetibilità, riproducibilità e accuratezza forniti dai test interlaboratoriali, almeno 10 laboratori hanno partecipato ai test. In taluni casi si è fatto ricorso a laboratori cooptati per l'occasione, esterni al gruppo di lavoro e scelti tra quelli che già svolgevano a livello di routine determinazioni analitiche riguardanti il parametro scelto.
Nel 2000 è stato istituito un gruppo di lavoro coordinato dall'APAT e formato dal Servizio di Metrologia Ambientale dell'APAT, dall'Istituto di Ricerca sulle Acque del Consiglio Nazionale

delle Ricerche (IRSA-CNR), dalle Agenzie Regionali per la Protezione dell'Ambiente (ARPA) e dalle Agenzie Provinciali per la Protezione dell'Ambiente (APPA) e dal Centro Tematico Nazionale "Acque interne e marino costiere" (CTN/AIM), che ha avuto il compito di effettuare una revisione critica ed una integrazione dei metodi analitici prodotti dalla Commissione istituita dall'IRSA-CNR. In questo quadro l'Agenzia Regionale per la Protezione dell'Ambiente della Regione Toscana (ARPAT), quale leader del CTN/AIM, ha provveduto a trasmettere i metodi analitici elaborati dalla Commissione IRSA-CNR ai direttori tecnici delle Agenzie Regionali e Provinciali per l'Ambiente, all'ICRAM e ai Dipartimenti Provinciali dell'ARPA Toscana. La stesura del testo finale del manuale "Metodi Analitici per le Acque" è stata curata dallo stesso gruppo di lavoro istituito nel 2000 che ha provveduto da un lato a integrare i metodi con modifiche talora sostanziali delle procedure adottate e ad uniformare il linguaggio utilizzato, e dall'altro a inserire i commenti, le osservazioni e le proposte di revisione raccolte dal CTN/AIM.

Gruppo di lavoro per la revisione critica ed integrazione dei metodi analitici prodotti dalla Commissione istituita dall'IRSA-CNR		
Maria BELLI (coordinatore)	APAT	Roma
Sabrina BARBIZZI	APAT	Roma
Carlo BRUSCOLI	ARPA Toscana	Pistoia
Silvio CAPRI	IRSA-CNR	Roma
Susanna CAVALIERI	ARPA Toscana	Firenze
Damiano CENTIOLI	APAT	Roma
Daniela CONTI	APAT	Roma
Antonio DALMIGLIO	ARPA Lombardia	Milano
Paolo de ZORZI	APAT	Roma
Alessandro FRANCHI	ARPA Toscana	Firenze
Chiara GALAS	APAT	Roma
Vittoria GIACOMELLI	ARPA Toscana	Firenze
Carolina LONIGRO	APAT	Roma
Michele LORENZIN	APPA Trento	Trento
Laura MANCINI	Istituto Superiore di Sanità	Roma
Maria Giovanna MARCHI	ARPA Toscana	Arezzo
Marco MAZZONI	ARPA Toscana	Firenze
Romano PAGNOTTA	IRSA-CNR	Roma
Maurizio PETTINE	IRSA-CNR	Roma
Umberto SANSONE	APAT	Roma
Alfonso SBALCHIERO	APAT	Roma
Maria Grazia SCIALOJA	ARPA Emilia Romagna	Modena
Elio SESIA	ARPA Piemonte	Asti
Luisa STELLATO	APAT	Roma
Luigi VIGANÒ	IRSA-CNR	Brugherio (Milano)

Di seguito sono riportati i componenti della Commissione IRSA-CNR e dei gruppi di lavoro istituiti per la revisione, l'aggiornamento e l'ampliamento dei metodi riportati nel Quaderno 100 "Metodi analitici per le acque", pubblicato dall'IRSA-CNR ed edito dal Poligrafico dello Stato nel 1994.

Commissione per la revisione, l'aggiornamento e la messa a punto di metodi analitici per le acque		
Presidente: Roberto PASSINO	IRSA-CNR	Roma
Coordinatore: Romano PAGNOTTA	IRSA-CNR	Roma
Segretario: Silvio CAPRI	IRSA-CNR	Roma
Componenti:		
Maurizio BETTINELLI	ENEL Produzione*	Piacenza
Luigi CAMPANELLA	Università degli Studi "La Sapienza"	Roma
Marina CAMUSSO	IRSA-CNR	Brugherio (Milano)
Paolo CESCON	Università "Ca' Foscari"	Venezia
Roger FUOCO	Università degli Studi	Pisa
Giorgio GILLI	Università degli Studi	Torino
Alfredo GORNI	ENI Ambiente	Ferrara
Alfredo LIBERATORI	IRSA-CNR	Roma
Letizia LUBRANO	Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio	Roma (dal 21/10/1998)
Roberto MORABITO	ENEA	Roma
Luigi OLORI	Istituto Superiore di Sanità	Roma (fino 23/9/1997)
Massimo OTTAVIANI	Istituto Superiore di Sanità	Roma (dal 23/9/1997)
Renato PERDICARO	Ministero per le Politiche Agricole	Roma
Maurizio PETTINE	IRSA-CNR	Roma
Mauro SANNA	ARPA Lazio	Roma
Roberto SPAGGIARI	ARPA Emilia Romagna	Reggio Emilia
Giorgio SUBINI	Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio	Roma (fino 21/10/1998)
Giovanni TIRAVANTI	IRSA-CNR	Bari
Pier Giorgio ZAMBONIN	Università degli Studi	Bari

** = Laboratorio di Igiene Ambientale e Tossicologia Industriale – Fondazione Salvatore Maugeri - Pavia*

Gruppo di lavoro - Campionamento		
Coordinatore: Paolo CESCON	Università "Ca Foscari"	Venezia
Componenti:		
Roberto BERTONI	Istituto Italiano di Idrobiologia	Pallanza (Verbania)
Paolo CARNIEL	ARPA Friuli-Venezia Giulia	Pordenone
Roberto MESSORI	ARPA Emilia Romagna	Reggio Emilia
Roberto MORABITO	ENEA	Roma
Herbert MUNTAU	Centro Comune di Ricerca CE	Ispra (Varese)
Mauro SANNA	ARPA Lazio	Roma
Letizia LUBRANO	Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio	Roma (dal 21/10/1998)
Giorgio SUBINI	Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio	Roma (fino 21/10/1998)
Gianni TARTARI	IRSA-CNR	Brugherio (Milano)

Gruppo di lavoro - Qualità del dato analitico		
Coordinatore: Roberto MORABITO	ENEA	Roma
Componenti:		
Maurizio BETTINELLI	ENEL Produzione*	Piacenza
Claudia BRUNORI	ENEA	Roma
Luigi CAMPANELLA	Università La Sapienza	Roma
Sergio CAROLI	Istituto Superiore di Sanità	Roma
Paolo CESCON	Università "Ca Foscari"	Venezia
Salvatore CHIAVARINI	ENEA	Roma
Roger FUOCO	Università degli Studi	Pisa
Roberto MESSORI	ARPA Emilia Romagna	Reggio Emilia
Rosario MOSELLO	Istituto Italiano di Idrobiologia	Pallanza (Verbania)
Herbert MUNTAU	Centro Comune di Ricerca CE	Ispra (Varese)
Stefano POLESELLO	IRSA-CNR	Brugherio (Milano)
Oreste SENOFONTE	Istituto Superiore di Sanità	Roma
Gianni TARTARI	IRSA-CNR	Brugherio (Milano)
Pier Giorgio ZAMBONIN	Università degli Studi	Bari

** = Laboratorio di Igiene Ambientale e Tossicologia Industriale – Fondazione Salvatore Maugeri - Pavia*

Gruppo di lavoro - Cromotografia ionica		
Coordinatore: Marina CAMUSSO	IRSA-CNR	Brugherio (Milano)
Componenti:		
Marco ACHILLI	ENEL	Segrate (Milano)
Emilia AIMO	ARPA Veneto	Venezia
Maurizio BETTINELLI	ENEL Produzione*	Piacenza
Adriano BORTOLUSSI	ARPA Friuli-Venezia Giulia	Pordenone
Camilla BRAGUGLIA	IRSA-CNR	Roma
Alberto CARNIEL	ARPA Friuli-Venezia Giulia	Pordenone
Ruggiero CIANNARELLA	IRSA-CNR	Bari
Raffaele CIRILLO	ARPA Friuli-Venezia Giulia	Pordenone
Maria Cristina CRISTOFORI	ENI Ambiente	Ferrara
Maria Letizia DAVI'	ARPA Emilia Romagna	Ferrara
Fabio DECET	ARPA Veneto	Belluno
Elena DELL'ANDREA	ARPA Veneto	Venezia
Annalisa FORESE	ARPA Veneto	Padova
Dario MARANI	IRSA-CNR	Roma
Giuseppe MARTINI	ARPA Veneto	Venezia
Cristina PASQUALETTO	ARPA Veneto	Venezia
Domenico PETRUZZELLI	Università degli Studi	Taranto
Stefano POLESELLO	IRSA-CNR	Brugherio (Milano)
Sandro SPEZIA	ENEL Produzione*	Piacenza
Gabriele TARTARI	Istituto Italiano di Idrobiologia	Pallanza (Verbania)
Sandro TORCINI	ENEA	Roma

** = Laboratorio di Igiene Ambientale e Tossicologia Industriale – Fondazione Salvatore Maugeri - Pavia*

Gruppo di lavoro - Metalli e composti organometallici		
Coordinatore: Luigi CAMPANELLA	Università degli Studi "La Sapienza"	Roma
Componenti:		
Claudio BALDAN	ARPA Veneto	Padova
Marina CAMUSSO	IRSA-CNR	Brugherio (Milano)
Silvio CAPRI	IRSA-CNR	Roma
Roberta FALCIANI	Centro Sviluppo Materiali S.p.A.	Roma
Fedele MANNA	Università La Sapienza	Roma
Walter MARTINOTTI	ENEL	Milano
Roberto MASCELLANI	ACOSEA	Ferrara
Domenico MASTROIANNI	IRSA-CNR	Roma
Roberto MESSORI	ARPA Emilia Romagna	Reggio Emilia
Giacomo MUCCIOLI	ENICHEM	Ravenna
Renato PERDICARO	Ministero per le Politiche Agricole	Roma
Fabio PETRINI	ARPA Toscana	Firenze
Domenico PETRUZZELLI	Università degli Studi	Taranto
Maurizio PETTINE	IRSA-CNR	Roma
Marcello SOLARI	AUSIMONT	Bollate (Milano)
Sandro SPEZIA	ENEL Produzione*	Piacenza
Sandro TORCINI	ENEA	Roma

** = Laboratorio di Igiene Ambientale e Tossicologia Industriale – Fondazione Salvatore Maugeri - Pavia*

Gruppo di lavoro - Microinquinanti organici		
Coordinatore: Pier Giorgio ZAMBONIN	Università degli Studi	Bari
Componenti:		
Rocco ARENA	Ente Autonomo Acquedotto Pugliese	Bari
Giuseppe BAGNUOLO	IRSA-CNR	Bari
Sabina BERTERO	ARPA Piemonte	Grugliasco (Torino)
Maurizio BETTINELLI	ENEL Produzione*	Piacenza
Edoardo BORGI	Azienda Acque Metropolitane Torino S.p.A	Torino
Silvio CAPRI	IRSA-CNR	Roma
Salvatore CHIAVARINI	ENEA	Roma
Ruggiero CIANNARELLA	IRSA-CNR	Bari
Carlo CREMISINI	ENEA	Roma

segue

segue

Gruppo di lavoro - Microinquinanti organici		
Maria Cristina CRISTOFORI	ENI Ambiente	Ferrara
Maria Letizia DAVÌ	ARPA Emilia Romagna	Ferrara
Antonio DI CORCIA	Università degli Studi "La Sapienza"	Roma
Marina FIORITO	ARPA Piemonte	Grugliasco (Torino)
Roger FUOCO	Università degli Studi	Pisa
Licia GUZZELLA	IRSA-CNR	Brugherio (Milano)
Franco GNUDI	Acquedotto CADF	Codigoro (Ferrara)
Giuseppe LAERA	IRSA-CNR	Bari
Antonio LOPEZ	IRSA-CNR	Bari
Luigi LORETI	IRSA-CNR	Roma
Attilio LUCCHI	ENEL Produzione	Piacenza
Giuseppe MASCOLO	IRSA-CNR	Bari
Gerardo MELCHIONNA	ARPA Piemonte	Grugliasco (Torino)
Francesco PALMISANO	Università degli Studi	Bari
Gabriella PASSARINO	ARPA Piemonte	Grugliasco (Torino)
Maria RADESCHI	ARPA Piemonte	Grugliasco (Torino)
Angelo ROLLO	ENI Ambiente	Ferrara
Paola ROSINA	ARPA Piemonte	Grugliasco (Torino)
Elisabetta RUSSO	ARPA Emilia Romagna	Piacenza
Giovanni TIRAVANTI	IRSA-CNR	Bari
Davide ZERBINATI	ENI Ambiente	Ferrara

** = Laboratorio di Igiene Ambientale e Tossicologia Industriale – Fondazione Salvatore Maugeri - Pavia*

Gruppo di lavoro - Metodi microbiologici		
Coordinatore: Lucia BONADONNA	Istituto Superiore di Sanità	Roma
Componenti:		
Rossella BRIANCESCO	Istituto Superiore di Sanità	Roma
Maurizio DIVIZIA	Università degli Studi di Tor Vergata	Roma
Domenica DONIA	Università degli Studi di Tor Vergata	Roma
Augusto PANÀ	Università degli Studi di Tor Vergata	Roma

Gruppo di lavoro - Metodi tossicologici		
Coordinatore: Roberto MARCHETTI	Università degli Studi	Milano
Sottogruppo "Metodi con batteri"		
Componenti:		
Ettore BIELLI	ARPA Piemonte	Novara
Gabriella CALDINI	ARPA Toscana	Firenze
Adelmo CORSINI	ARPA Toscana	Pistoia
Silvio GAITER	ARPA Liguria	Genova
Enrico GARROU	ARPA Piemonte	Grugliasco (Torino)
Piero GIANSANTI	ARPA Piemonte	Grugliasco (Torino)
Licia GUZZELLA	IRSA-CNR	Brugherio (Milano)
Teresa MAGNANI	ARPA Lombardia	Mantova
Pierluigi RAMPA	ARPA Piemonte	Torino
Giancarlo SBRILLI	ARPA Toscana	Piombino (Livorno)
Roberto SPAGGIARI	ARPA Emilia Romagna	Reggio Emilia
Sottogruppo "Metodi con crostacei"		
Componenti:		
Miriam AMODEI	ARPA Lombardia	Milano
Eros BACCI	Università degli Studi	Siena
Renato BAUDO	Istituto Italiano Idrobiologia	Pallanza (Verbania)
Melania BUFFAGNI	AGIP	San Donato Milanese (MI)
Nidia DE MARCO	ARPA Friuli-Venezia Giulia	Pordenone
Maria FERRARO	AGIP	San Donato Milanese (MI)
Silvia MARCHINI	Istituto Superiore di Sanità	Roma

segue

segue

Gruppo di lavoro - Metodi tossicologici		
Maria Angela PASINI	ARPA Lombardia	Pavia
Pierluigi RAMPA	ARPA Piemonte	Torino
Giancarlo SBRILLI	ARPA Toscana	Piombino (Livorno)
Luigi VIGANÒ	IRSA-CNR	Brugherio (Milano)
Sottogruppo "Metodi con *Artemia sp.*"		
Componenti:		
Mario BUCCI	ARPA Toscana	Piombino (Livorno)
Melania BUFFAGNI	AGIP	San Donato Milanese (MI)
Silvio GAITER	ARPA Liguria	Genova
Licia GUZZELLA	IRSA-CNR	Brugherio (Milano)
Luciana MIGLIORE	Università degli Studi di Tor Vergata	Roma
Sottogruppo "Metodi con pesci"		
Componenti:		
Attilio ARILLO	Università degli Studi	Genova
Rossella AZZONI	ARPA Lombardia	Milano
Eros BACCI	Università degli Studi	Siena
Loredana BONALBERTI	ARPA Emilia Romagna	Ferrara
Mario BUCCI	ARPA Toscana	Piombino (Livorno)
Anna Maria CICERO	ICRAM	Roma
Luigi VIGANÒ	IRSA-CNR	Brugherio (Milano)

Gruppo di lavoro - Metodi biologici		
Coordinatore: Roberto MARCHETTI	Università degli Studi	Milano
Componenti:		
Franco BAMBACIGNO	Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio	Roma
Anna BARRA CARACCIOLO	IRSA-CNR	Roma
Maurizio BATTEGAZZORE	ARPA Piemonte	Cuneo
Ettore BIELLI	ARPA Piemonte	Novara
Andrea BUFFAGNI	IRSA-CNR	Brugherio (Milano)
Giuseppe FORNARA	ARPA Piemonte	Novara
Pier Francesco GHETTI	Università "Ca' Foscari"	Venezia
Sergio MALCEVSCHI	Università degli Studi	Pavia
Romano PAGNOTTA	IRSA-CNR	Roma
Alberto PUDDU	IRSA-CNR	Roma
Bruno ROSSARO	Università degli Studi	Milano
Roberto SPAGGIARI	ARPA Emilia Romagna	Reggio Emilia
Annamaria ZOPPINI	IRSA-CNR	Roma

1000 - PARTE GENERALE

In questa parte si forniscono informazioni preliminari all'applicazione dei metodi riportati nel manuale. In particolare vengono descritte le strutture, attrezzature e reattivi di laboratorio ritenuti indispensabili per la buona pratica di laboratorio; apparecchiature più sofisticate impiegate in tecniche avanzate quali la gascromatografia, la cromatografia liquida, il plasma, la spettrometria di massa vengono descritte nella Sezione 1020 "Lineamenti di tecniche analitiche". La Sezione 1030 fornisce alcuni cenni sulle modalità di campionamento e conservazione del campione, mentre la Sezione 1040 "Qualità del dato analitico" riporta le nozioni basilari riguardanti la valutazione dell'incertezza di misura e la trattazione statistica dei dati sperimentali.

1010. Strutture, attrezzature e reattivi di laboratorio

1. Principali servizi del laboratorio di analisi

1.1 Aria compressa

L'aria compressa da impiegare in laboratorio deve essere di elevata qualità e quindi è necessario prendere tutte le precauzioni possibili per mantenerne elevato il grado di purezza, soprattutto nei riguardi delle impurezze più comuni (acqua, grasso, polvere).
Nel caso in cui siano richieste pressioni inferiori a 50 psi (3,5 atm) un compressore del tipo rotativo, che non richiede alcuna aggiunta di olio, è senz'altro il più conveniente, in quanto si evitano le noiose operazioni di eliminazione delle tracce di olio che generalmente passano nel flusso di aria. Nel caso di pressioni più elevate è opportuno impiegare compressori grandi, orizzontali, raffreddati ad acqua.
La compressione, riscaldando l'aria, fa sì che questa trattenga una certa quantità di acqua per cui è necessaria un'operazione di post-raffreddamento per eliminare l'acqua trattenuta. Inoltre, al fine di impedire il passaggio dell'acqua trattenuta nel circuito di utilizzo, possono essere impiegati filtri assorbenti o setacci molecolari. In qualche caso può essere opportuno creare, all'interno di ogni singolo laboratorio, un sistema a filtri di purificazione dell'aria compressa prima del suo impiego diretto nelle operazioni di analisi. I materiali con cui si realizzano i circuiti sono, generalmente, acciaio e rame.

1.2 Alimentazione elettrica

Un moderno laboratorio deve disporre di un adeguato sistema elettrico, che comprenda alimentazioni a 220 e 380 volt con capacità adeguate al lavoro che si deve compiere. Vanno inoltre considerate necessità particolari, correlate alla utilizzazione di speciali sistemi indicatori, di strumentazione ad «alta corrente», di illuminazione «eccezionale» e di alimentazioni «specifiche».
Per comprendere questi particolari aspetti basti pensare alla necessità di disporre di condizioni di luminosità favorevoli per compiere correttamente alcune delle operazioni fondamentali tipiche del laboratorio chimico, quali la valutazione di un viraggio e la lettura su una scala graduata; ed ancora alla delicata e complicata natura di alcuni componenti di apparecchiature routinarie (cromatografi, spettrofotometri, spettrografi) che non possono prescindere, per il loro corretto funzionamento, dalla necessità di disporre di un'alimentazione altamente stabilizzata, non sempre predisposta all'interno dei suddetti apparecchi.
In tal caso, al fine di evitare che nei singoli componenti si producano variazioni di resistenza, temperatura, corrente, rendimento, è opportuno inserire nel circuito di alimentazione uno stabilizzatore di tensione che può essere, a seconda delle esigenze, del tipo commerciale a trasformatore o di qualità migliore o più raffinata. Per il funzionamento di fornelli riscaldanti, muffole, forni, bagni ad acqua e stufe è opportuno impiegare tensione a 220 volt.
Assolutamente indispensabile ai fini della sicurezza è che tutta la strumentazione, alimentata elettricamente, sia «accuratamente» messa a terra e sia conforme alle norme C.E.I., come pure lo devono essere le prese di corrente.
Infine, è consigliabile disporre di un gruppo di continuità al fine di assicurare una erogazione continua di corrente anche in caso di interruzioni sulla rete.

1.3 Cappe di aspirazione

Di massima le cappe impiegate per manipolazioni di sostanze chimiche devono essere installate lontano da porte, finestre, zone di passaggio, sorgenti d'aria in genere, che potrebbero interferire con i sistemi di ventilazione-estrazione delle cappe stesse e provocare la fuoriuscita di inquinanti, con conseguente contaminazione ambientale e possibilità di inalazione da parte degli operatori. È opportuno rilevare al riguardo che il passaggio di una persona davanti ad una cappa aperta (velocità di passaggio di 2 km/h) provoca una corrente trasversale, verso l'esterno della cappa e quindi verso l'ambiente, di circa 0,55 m/s, valore questo dello stesso ordine di grandezza del limite comunemente accettato di velocità frontale di imbocco aria a cappa completamente aperta (0,4 m/s).
Nel caso di lavorazioni pericolose devono essere evitate le cappe "centrali", e quindi tale tipo di cappa è generalmente sconsigliato.
Le cappe devono essere dotate nella zona superiore di una parte cedevole e la loro struttura deve essere preferibilmente di materiale incombustibile o ignifugo (classe 0 o 1 di reazione al fuoco). I vetri devono essere del tipo "di sicurezza" e le guide in cui scorre il frontale delle cappe devono essere dotate di schermi in basso, in modo da limitare "l'effetto ghigliottina" in caso di caduta del frontale stesso.
Nelle cappe l'aspirazione (velocità frontale dell'aria di circa 30 m^3/min, che può arrivare a 40-50 m^3/min nel caso di sostanze pericolose) deve essere distribuita sia in alto che in basso. Per ammine aromatiche e sostanze cancerogene devono essere previste cappe separate ad uso esclusivo, adeguatamente contrassegnate.
Nel seguito sono riportate le caratteristiche dei più comuni tipi di cappe attualmente in commercio.

1.3.1 Cappe standard

In questo tipo di cappe il volume e la velocità dell'aria aspirata varia a seconda del grado di apertura del pannello frontale. Queste cappe, pur presentando ottime caratteristiche dal punto di vista della sicurezza, possono creare notevoli difficoltà dal punto di vista del bilancio termico dell'aria ambiente. Per questo motivo è necessario dotare il laboratorio di prese d'aria supplementari al fine di assicurare un'adeguata ventilazione.

1.3.2 Cappe a portata costante

In queste cappe la presenza di un "by-pass", comandato dalla posizione del pannello frontale (aperto-chiuso), consente, in qualsiasi condizione operativa, l'espulsione di un volume costante di aria. Tale configurazione permette un dimensionamento ottimale dei filetti fluidi evitando l'instaurazione di regimi turbolenti del flusso e semplifica inoltre i problemi di bilanciamento termico dell'ambiente.
La diffusa abitudine di convogliare scarichi di cappe mediante condotte orizzontali fino a raggiungere la più vicina finestra è decisamente sconsigliabile. Ai fini di una migliore diluizione atmosferica, è opportuno che la massa d'aria allo scarico sia animata di velocità verticale di qualche metro al secondo.
Nella manipolazione di sostanze tossiche, cancerogene, ecc. è indispensabile procedere ad una filtrazione dell'aria prima dello scarico (dimensione delle particelle del materiale filtrante: 0,3 μm) mediante l'impiego di filtri a carbone attivo, di filtri assoluti e di sistemi di intrappolamento specifico, posti immediatamente a valle dell'estrattore.
Nel caso di apparecchi da laboratorio di dimensioni tali da non poter essere contenuti nelle normali cappe si fa ricorso a box aspiranti per i quali valgono le considerazioni fatte in precedenza.

1.4 Ambiente per bombole

Tutte le bombole dei gas che servono in un laboratorio chimico di analisi devono essere poste in un ambiente esterno costruito secondo le norme contenute nel D.M. n. 24 del 24.11.84.
Il materiale con il quale si deve realizzare il sistema di erogazione è generalmente acciaio.

2. Acqua distillata e/o deionizzata

L'acqua distillata o deionizzata è impiegata per le diluizioni, per preparare le soluzioni dei reattivi, per il risciacquo della vetreria.
La purezza dell'acqua può essere definita da indici diversi in relazione al metodo impiegato; il più comune fa riferimento alla resistenza specifica che, per un'acqua di adeguata purezza, non deve essere inferiore a 500.000 ohms. Sulla base di tale parametro è stata anche definita tentativamente una scala di purezza (Tab. 1).

Tabella 1: Classificazione dell'acqua in base al grado di purezza

Qualità dell'acqua	Conduttività massima (µS/cm)	Contenuto elettroliti (mg/L)
Estremamente pura	0,055	<0,0001
Ultrapura	0,1	0,01-0,02
Molto pura	1	0,2-0,5
Pura	10	2-5

Altro criterio di valutazione della purezza di un'acqua, relativo alla presenza di sostanze organiche, è quello che si basa sulla durata della colorazione del permanganato di potassio (Tab. 2).

Tabella 2: Classificazione dell'acqua in base alla durata (t*) della colorazione del $KMnO_4$

Grado di purezza	t* (minuti)	Conducibilità (µS/cm)	Materiale disciolto (mg/L)
I	60	0,06	0,01
II	60	1,0	0,1
III	10	1,0	1,0
IV	10	5,0	2,0

L'acqua distillata ordinaria normalmente non è pura; essa contiene gas disciolti, sostanze organiche volatili distillate con l'acqua e sostanze non volatili trascinate dal vapore sotto forma di "spray" durante la distillazione. La concentrazione di tutte queste impurezze è generalmente molto bassa, tanto che l'acqua distillata viene impiegata per molte analisi senza ulteriore purificazione.
Lo stato di purezza dell'acqua può anche essere compromesso da contaminanti provenienti dai distillatori, dalle tubazioni, dai rubinetti e dai contenitori, che, se di materiale non idoneo, possono cedere contaminanti diversi a seconda della loro natura.
Come si è detto sopra un elemento che può determinare in misura notevole il grado di purezza dell'acqua distillata è il materiale del quale è costituito il distillatore, che, generalmente, può essere o metallico o di vetro. Si ricorre di solito al metallo per distillare grossi quantitativi di acqua ed al vetro quando si desidera ottenere acqua distillata di più elevato grado di purezza. Nel caso di distillatori metallici (rame, ottone, bronzo) l'acqua prodotta può contenere fino a 9 µg/L di Zn, 26 µg/L di Pb e 11 µg/L di Cu; valori molto più bassi si ottengono nel caso di distillatori di vetro (rispettivamente <1 µg/L, <2 µg/L e <5 µg/L).
Tutti i distillatori richiedono periodici interventi di pulizia, la cui frequenza è da correlare direttamente alla durezza dell'acqua di alimentazione. Nei casi di acqua molto dura può risultare vantaggioso addolcire l'acqua, prima di introdurla nel distillatore, mediante resina scambiatrice cationica che può poi essere rigenerata. Può anche essere utile, prima della distillazione, un passaggio dell'acqua di alimentazione su carbone per eliminare il materiale organico presente. Il passaggio del distillato su colonne a letto misto può essere necessario nel caso in cui si desideri acqua a basso contenuto ionico. In commercio sono disponibili sistemi di purificazione aggiuntivi già pronti da adattare all'uscita del contenitore dell'acqua distillata. In questi sistemi, basati sull'impiego di resina scambiatrice di ioni, le colonne vanno periodicamente sostituite e rigenerate in laboratorio o inviate alla casa costruttrice per la rigenerazione.

Tali sistemi sono anche dotati, sia in entrata che in uscita, di conduttimetri incorporati che forniscono indicazioni circa il fattore di guadagno in purezza dell'acqua distillata.
Per quanto concerne le tubazioni i materiali più idonei per la loro realizzazione sono stagno, ottone stagnato, acciaio inossidabile, plastica e vetro. Lo stagno è il migliore ma è anche assai costoso, per cui un accettabile compromesso è rappresentato da materiale plastico o da vetro con guarnizioni in teflon.
Quando non è disponibile un sistema di distribuzione automatico a circuito, il trasporto dell'acqua distillata deve essere effettuato in contenitori di vetro o di polietilene, in genere del volume di 20 litri. Il contenitore di vetro deve essere del tipo esente da borosilicato, per prevenire il rilascio di materiale solubile; i contenitori di polietilene presentano lo svantaggio di rilasciare nel tempo i plastificanti organici incorporati, il che può creare problemi nel caso di analisi di sostanze organiche a livello di tracce. Se si dispone di un sistema di distribuzione è opportuno che la parte immersa nel contenitore sia costituita da vetro (meglio che da gomma) e la parte esterna, ai fini di una maggiore flessibilità, da gomma o meglio da resina vinilica. È opportuno in ogni caso prevedere sistemi protettivi antipolvere.
L'acqua distillata comune è generalmente idonea alla maggior parte delle analisi; in alcuni casi però è necessario ricorrere ad una bi- o tri-distillazione eventualmente in presenza di permanganato alcalino per ridurre al minimo la presenza di materiale organico.
Nel caso di determinazioni di sostanze organiche a livello di tracce, mediante metodi di distribuzione fra fasi (in particolare estrazione con solventi e cromatografia), è opportuno preestrarre l'acqua con il solvente che verrà impiegato per l'analisi. Esigenze particolari possono richiedere acqua "assolutamente" esente da ammoniaca, da anidride carbonica o da ioni in genere. Per la rimozione di tali impurezze, nel primo caso si dibatte l'acqua con uno scambiatore cationico forte, nel secondo si ricorre all'ebollizione per 15 minuti o allo spostamento mediante vigorosa aerazione con una corrente di gas inerte (azoto in genere), nel terzo si passa l'acqua su scambiatore a letto misto (acido forte + base forte) che consente di arrivare a concentrazioni ioniche massime di 0,1 μg/L (conduttività 0,06 μS/cm).

3. Strumentazione

Il continuo rinnovamento legato allo sviluppo dell'elettronica e dell'informatica porta alla produzione di apparecchiature sempre meno ingombranti, più versatili ed automatiche. Di fatto si può senz'altro affermare che la qualità media della strumentazione nei laboratori analitici è in continuo progresso: molto più lenta è l'evoluzione nel tipo di apparecchiature ritenute indispensabili.
I principali strumenti di base dei laboratori di analisi delle acque possono essere individuati in: bilancia, potenziometro (pHmetro), elettrodi iono-selettivi, conduttimetro, stufa, muffola, analizzatore per il carbonio, spettrofotometro (visibile, UV, IR) e assorbimento atomico, cromatografo (cromatografo liquido, gascromatografo, cromatografo ionico). Come si vede soltanto alcuni di questi strumenti sono realmente legati allo sviluppo più recente della strumentazione analitica.

3.1 Bilancia

La bilancia, considerato lo strumento più impiegato in laboratorio, richiede la massima protezione e cura per garantire l'attendibilità dei dati sperimentali. I tipi di bilancia disponibili sul mercato sono veramente numerosi e capaci di soddisfare le più disparate esigenze. La bilancia analitica più comune è quella del tipo a singolo piatto con portata massima da 80 a 200 g e risoluzione fra 0,01 e 1 mg. Il funzionamento è meccanizzato al massimo su tutte le operazioni della pesata (caricamento dei pesi, lettura, azzeramento).
Il principale vantaggio rispetto al modello a due piatti è rappresentato dalla maggiore velocità operativa e da una più elevata accuratezza. Anche nei modelli più moderni la bilancia resta però uno strumento assai delicato rispetto all'influenza che su di esso possono esercitare vibrazioni, variazioni di temperatura ed umidità, cattiva manutenzione. È pertanto necessario ricorrere ad accorgimenti capaci di limitare i danni di queste possibili influenze.

È quindi opportuno che la bilancia si trovi in un locale diverso da quello del laboratorio, nel quale non vi siano gradienti di temperatura; deve essere collocata su di un tavolo antivibrante, regolando la perfetta planimetria del piano di pesata mediante l'impiego di una livella a bolla e quando non è utilizzata deve essere bloccata in posizione di riposo. Periodicamente le bilance vanno tarate con masse campione nei diversi intervalli di masse certificate da centri SIT. Durante l'impiego vanno prese tutte le precauzioni affinchè le sostanze utilizzate non provochino danni all'interno o al piatto della bilancia, che deve essere sempre mantenuta pulita. È infine opportuno ricorrere, dopo il collaudo, a periodiche visite di controllo da parte di specialisti che possano garantire sul buon funzionamento della bilancia, che in ogni caso dipende anche dal sempre attento e meticoloso rispetto delle istruzioni di impiego.

3.2 pHmetro

Gli elementi essenziali di un pHmetro sono una sorgente di tensione, un sistema di amplificazione ed un quadrante di lettura, analogico o digitale. I primi modelli commerciali risalgono agli anni '40, ma da allora, grazie all'elettronica (circuiti a stato solido e transistor al posto delle valvole) sono stati realizzati notevoli progressi costruttivi soprattutto per quanto si riferisce alla stabilità, alla rapidità di riscaldamento, all'accuratezza, alla possibilità di leggere su scale espanse (nella routine + 0,1 unità pH sembrano però sufficienti), al controllo della temperatura, alla regolazione della pendenza al valore corretto (nel caso di presenza di potenziali di asimmetria dell'elettrodo a vetro), alla compattezza dello strumento, ecc. Altri «optionals» proposti riguardano le scale di lettura per elettrodi iono-selettivi, le uscite per registratori, le interfacce per computer.
Nell'analisi di routine gli elettrodi impiegati sono quelli a vetro (indicatore di pH) e quello a calomelano (riferimento). Gli elettrodi a vetro commerciali di uso generale non possono essere utilizzati in soluzioni il cui pH sia superiore a 11 (errore alcalino) nè in soluzioni fortemente acide. Esistono comunque in commercio elettrodi che non risentono dell'errore alcalino e possono quindi essere utilizzati fino a pH 14. Quando si esegue una misura si deve far precedere la misura stessa da un adeguato tempo di ambientamento degli elettrodi nella soluzione in esame; gli elettrodi, dopo l'impiego, devono essere ben lavati con acqua distillata e conservati in acqua distillata (quello a vetro, in particolare, non deve mai essere lasciato a secco).
Nelle misure in ambiente non tamponato particolare attenzione va posta nell'agitazione della soluzione; inoltre nell'effettuare la misura si deve tener conto della maggiore lentezza di risposta rispetto a misure condotte in ambiente tamponato. Le stesse considerazioni valgono quando si passa da un tipo di ambiente ad un altro o dopo le operazioni di taratura. Quest'ultima operazione si esegue immergendo i due elettrodi in una soluzione tampone a pH noto, regolando il valore letto al valore del pH tampone, fissando il compensatore di temperatura, di cui dispone il pHmetro, al valore della temperatura della soluzione in esame. Il pH della soluzione di riferimento deve essere entro ±2 unità rispetto al pH da misurare. Al fine di una maggiore accuratezza è opportuno che la taratura avvenga con almeno due soluzioni di riferimento (Tab. 3) i cui valori di pH definiscano un intervallo all'interno del quale cade il valore del pH incognito.

Tabella 3: Valori di pH di soluzioni di riferimento

T(°C)	Tetraossalato di potassio (0,05 M)	Soluzione satura a 25°C di tartrato acido di potassio	Ftalato acido di potassio (0,05 M)	Fosfato monopotassico (0,025 M) Fosfato disodico (0,05 M)	Sodio tetraborato (0,01 M)
0	1,67	—	4,01	6,98	9,46
10	1,67	—	4,00	6,92	9,33
15	1,67	—	4,00	6,90	9,27
20	1,68	—	4,00	6,88	9,22
25	1,68	3,56	4,01	6,86	9,18
30	1,69	3,55	4,01	6,85	9,14

Tale procedura consente anche di individuare elettrodi difettosi: dopo la misura nella prima soluzione di riferimento si ottengono per la seconda valori molto diversi da quello effettivo (un elettrodo di vetro rotto fornisce spesso lo stesso valore di pH in entrambe le soluzioni di riferimento). Una risposta errata dell'elettrodo può anche essere determinata dal fatto che il livello della soluzione di cloruro di potassio al suo interno è troppo basso o dalla presenza di sostanze grasse o precipitati che ne ricoprono la superficie; si deve allora ricorrere ad un rabbocco della soluzione o ad una operazione di pulizia.
Nel caso in cui la misura venga condotta in una soluzione la cui temperatura sia diversa da quella della soluzione tampone con cui si è effettuata la taratura, bisogna tener conto che il potenziale del sistema elettrodico varia di 0,20 mV per unità di pH e per grado; una regola approssimata suggerisce 0,05 unità di pH per ogni 5 gradi in più di temperatura.
In Tab. 4 sono indicate le caratteristiche di un pH-metro.

Tabella 4: Caratteristiche di un comune pHmetro commerciale

Funzioni e caratteristiche	Scala normale	Scala espansa
Intervallo di pH	0-14 pH (±1400 mV)	
Minima divisione sulla scala	0,1 pH (10 mV)	0,005 pH (0,5 mV)
Accuratezza	0,05 pH (±5 mV)	0,002 pH (±2% del valore letto)
Riproducibilità	0,02 pH (±2 mV)	0,002 pH (±0,2 mV)
Compensazione per la temperatura	0-100°C (man. o autom.)	-
Impedenza di ingresso	$>10^{14}$	$>10^{13}$
Alimentazione	115/220 V, 50-60 Hz	-

3.3 Elettrodi iono-selettivi

Negli ultimi anni sono comparsi in commercio numerosi elettrodi a membrana in cui il potenziale di membrana è selettivo verso un determinato ione o più ioni. Detti elettrodi, ormai disponibili per cationi ed anioni, misurano l'attività dello ione libero mentre le specie a cui lo ione è legato, soprattutto quelle non ionizzate, non vengono apprezzate. A questo gruppo di elettrodi appartengono anche gli elettrodi a diffusione gassosa che consentono la determinazione di gas o di specie trasformabili in gas (direttamente o mediante reazione chimica).
Gli elettrodi iono-selettivi per la rapidità di impiego, la possibilità di effettuare determinazioni "in situ", la versatilità, spesso anche in relazione a problemi di interferenza, hanno assunto un crescente interesse. Sono attualmente disponibili elettrodi per la determinazione del fluoruro, dell'ossigeno disciolto, del solfuro, dell'ammoniaca e del cloruro.
Le determinazioni mediante elettrodi iono-selettivi si possono effettuare tramite rette di taratura ottenute:

- facendo due letture, una a zero ed una ad una concentrazione vicina a quella del campione (si determina la pendenza);
- facendo tre letture una a zero e le altre due a due valori di concentrazione che limitano un intervallo all'interno del quale cade la concentrazione da determinare (si determina la eventuale curvatura dell'attesa retta di taratura e la pendenza);
- facendo più letture, una a zero e le altre in corrispondenza di concentrazioni variabili secondo decadi 1, 10, 100, 1000, ecc. (si determina la retta o la curva di taratura), oppure adottando il metodo delle aggiunte.

$$E_1 = E_0 + \frac{RT}{nF}\log a_1 \ (soluzione\ \ incognita\ \ volume\ \ V)$$

$$E_2 = E_0 + \frac{RT}{nF}\log a_2 \ \ (soluzione\ incognita + volume\ soluzione\ a\ titolo\ noto\ C_n)$$

Operando in tampone di forza ionica, in modo da poter considerare costante il coefficiente di attività, si ha:

$$E_2 - E_1 = \frac{RT}{nF} \log \frac{C_x \frac{V}{V+v} + C_n \frac{v}{V+v}}{C_x}$$

dove C_x è la concentrazione incognita.

Ponendo:

$$\frac{C_n}{C_x} = Q$$

l'espressione di sopra diventa:

$$\Delta E = \frac{RT}{nF} \log \left(\frac{V}{V+v} + Q \frac{v}{V+v} \right)$$

Noti i volumi di partenza (V) e dell'aggiunta (v), misurando E si ricava Q. Partendo dall'espressione $C_n/C_x = Q$, poichè è anche noto C_n, si ricava la concentrazione incognita C_x.
Quest'ultimo metodo ha il vantaggio di poter prescindere da possibili interferenze e dall'effetto matrice; non è comunque possibile dare una regola definitiva valida per tutti gli elettrodi.
Quando un elettrodo selettivo comincia a funzionare male le cause più comuni sono il grado di secchezza ed il non completo riempimento con la soluzione interna: in tutti e due i casi si deve intervenire secondo quanto suggerito nelle istruzioni.

3.4 Conduttimetro

Le soluzioni elettrolitiche conducono la corrente elettrica per effetto del movimento degli ioni sotto l'azione del campo elettrico. Per una forza elettromotrice applicata costante, la corrente che passa è inversamente proporzionale alla resistenza. L'inverso della resistenza viene chiamato conduttanza e si misura in siemens, ma, per acque naturali, tenuto conto dei bassi valori rilevati, si preferisce ricorrere ai microsiemens.
Il passaggio della corrente elettrica attraverso una soluzione di elettrolita provoca delle alterazioni all'interno della soluzione stessa; così, per prevenire la polarizzazione, è opportuno lavorare con corrente alternata o con corrente pulsata. Originariamente i conduttimetri utilizzavano correnti alternate di bassa intensità nel campo delle onde radio; successivamente il segnale sonoro è stato sostituito da un tubo a raggi catodici, il ben noto "occhio magico", e con sistemi di resistenze variabili è stato possibile ampliare l'intervallo di misura consentito dallo strumento tanto che oggi è possibile determinare conduttanze fra 0,1 e 250.000 µS.
La cella di misura è costituita da due elettrodi metallici platinati rigidamente supportati e paralleli; alternativamente alcune celle sono caratterizzate da elettrodi circolari di carbone annegato in una plastica epossidica. In ogni caso gli elettrodi sono protetti da un tubo di vetro o di plastica forniti di accesso all'interno.
Particolare attenzione va posta all'isolamento dei tubi che portano la tensione agli elettrodi.
Periodicamente è opportuno controllare che la platinatura degli elettrodi sia integra, che sugli elettrodi non si siano formati depositi di varia natura che ne modifichino la superficie, che essi non siano distorti o piegati con alterazioni delle condizioni di rigido parallelismo.
Tenuto conto dell'influenza della temperatura sulla conducibilità, le misure debbono essere eseguite termostatando la soluzione in esame alla temperatura di 25°C (comunemente assunta come temperatura di riferimento); alternativamente si può ricorrere a metodi di compensazione matematici o elettronici. Il metodo della termostatazione è comunque da preferi-

re. Alcuni inconvenienti che si possono produrre durante le misure conduttometriche sono spesso imputabili alla non perfetta pulizia della cella.
La caratteristica elettrochimica della cella di misura è il "fattore di cella" (fattore di proporzionalità tra conduttività e conduttanza) espresso come rapporto fra la superficie elettrodica e la distanza fra i due elettrodi. Tale valore è una costante della cella che bisogna conoscere per fornire i risultati di resistenza o conducibilità di una qualsiasi soluzione. Il fattore di cella viene determinato misurando la conducibilità di soluzioni a conducibilità nota; poichè esso può subire variazioni è opportuno che tale determinazione sia ripetuta periodicamente (Tab. 5).

Tabella 5: Conduttività elettrica di soluzioni di riferimento di cloruro di potassio

Soluzione	Normalità	Preparazioni	Temperatura (°C)	Conduttività (µS/cm)
A	0,1	7,4365 g KCl/L (a 20°C)	0 18 25	7138 11167 12856
B	0,01	0,7436 g KCl/L (a 20°C)	0 18 25	773,6 1220,5 1408,8
C	0,001	diluire 100 mL di B a 1 L (a 20°C)	25	146,93

Per gli strumenti che leggono in S, il "fattore di cella" si calcola come segue:

$$\text{Fattore di cella} = \frac{K_1 + K_2}{10^6 \cdot K_x}$$

dove:

K_1 = conduttività (µS/cm) della soluzione di KCl alla temperatura di misura;
K_2 = conduttività (µS/cm) della soluzione di KCl alla stessa temperatura dell'acqua distillata impiegata per preparare la soluzione di riferimento;
K_x = conduttanza (µS).

3.5 Spettrofotometro

Poichè un gran numero delle determinazioni quantitative che si effettuano per l'analisi delle acque sono basate su metodi colorimetrici, lo spettrofotometro è una delle apparecchiature più comuni in un laboratorio di analisi delle acque.
È questo uno strumento assai versatile, in grado di rispondere ad esigenze di natura diversa e per il quale il numero di modelli disponibili è in continua crescente espansione.
Lo spettrofotometro misura, in funzione della lunghezza d'onda, la quantità di luce o di energia raggiante trasmessa attraverso una soluzione; esso differisce da un fotometro a filtri in quanto utilizza luce rigorosamente monocromatica la cui lunghezza d'onda varia senza interruzione di continuità. I fotometri a filtro sono assai meno sensibili e versatili e vengono generalmente impiegati nel caso di analisi "routinarie" di un solo tipo di analita.
Le parti essenziali di uno spettrofotometro sono: la sorgente di energia raggiante (che varia a seconda del campo di lunghezza d'onda prescelto), il monocromatore (prisma o reticolo), le celle che contengono il campione e la soluzione di riferimento (bianco), il rivelatore. Lo schema dell'apparecchio è riportato in Fig. 1.

Soprattutto il secondo e l'ultimo elemento variano da modello a modello: in particolare il monocromatore può essere un prisma di vetro o di quarzo oppure un reticolo con differenti caratteristiche; il rivelatore è un fototubo con varie possibilità di impiego ed in qualche caso con l'agevolazione di intercambiabilità.

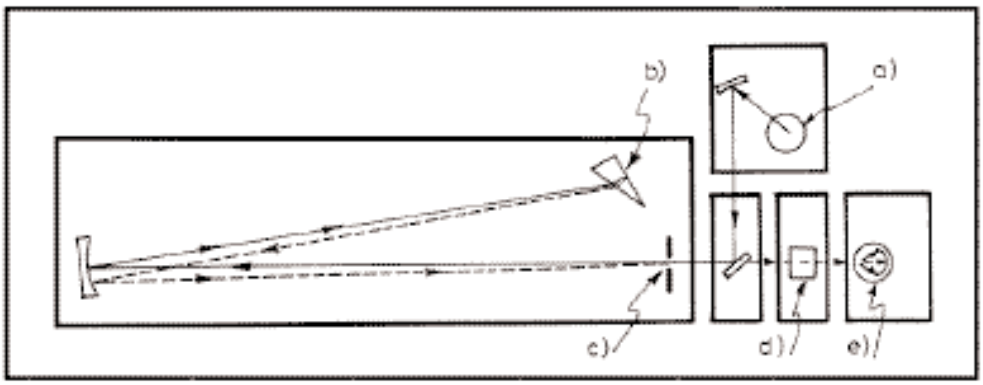


Figura 1: Schema di uno spettrofotometro. a = sorgente; b = prisma riflettente; c = fenditura; d = cella; e = fototubo (rivelatore).

A seconda del campo di lunghezza d'onda per il quale vengono predisposti, gli spettrofotometri sono attualmente classificati:

- spettrofotometri per il visibile, che impiegano una sorgente di luce costituita in genere da una lampada a filamento di tungsteno;
- spettrofotometri per l'ultravioletto che impiegano una sorgente di luce costituita da una lampada ad idrogeno o a deuterio, che emette radiazioni nella zona 200-400 nm ed un monocromatore generalmente a prisma di quarzo. Nel caso di un monocromatore a reticolo questo, per poter essere impiegato nell'ultravioletto, deve essere opportunamente preparato;
- spettrofotometri per l'infrarosso che richiedono alcune modifiche legate sia al materiale ottico (che non può essere nè quarzo nè vetro i quali assorbono in questa regione dello spettro), che al sistema di rivelazione, in quanto le fotocelle non rispondono. In questi ultimi per eliminare la necessità che l'energia emessa dalla sorgente debba passare attraverso quarzo, vetro o lenti di altro materiale si ricorre a sistemi di specchi parabolici capaci di concentrare l'energia IR diffusa. Si rendono inoltre necessari accurati sistemi protettivi dell'ambiente in quanto il vapore acqueo e quindi l'umidità deteriorano il sistema ottico; si debbono inoltre evitare bande spurie di assorbimento IR. La sorgente può essere costituita o da un filamento incandescente di Nerst (miscela di ossidi di terre rare) o da un Globar (bacchetta di carburo di silicio sinterizzato). Ciascuna delle due soluzioni ha caratteristiche che ne raccomandano l'adozione, ma il Globar è più impiegato per la maggiore stabilità e robustezza, inoltre è più efficiente a lunghezze d'onda superiori a 15 mm. Il sistema di rivelazione è costituito da una termocoppia, un transistor o una cella a fotoconducibilità.

Per quanto concerne le celle di misura, queste debbono essere assolutamente pulite e se ne deve verificare l'assoluta equivalenza del valore della densità ottica a varie lunghezze d'onda. Le celle possono essere da 1,0 - 1,1 - 1,6 - 2,0 - 3,0 - 4,0 - 5,0 - 10 - 20 cm e debbono essere trasparenti nella regione delle lunghezze d'onda in cui si effettuano le misure.
Nel visibile possono essere utilizzate celle di vetro, quarzo o silice fusa; questi due ultimi materiali debbono essere impiegati per misure nella regione dell'ultravioletto. Nell'infrarosso il vetro e la silice fusa trasmettono poco; si impiegano quindi celle con finestre di cloruro di sodio (che vengono utilizzate nell'intera regione 2,5-15,4 mm); per lunghezze d'onda più alte (10-20 mm) si può usare bromuro di potassio.
È importante ricordare che il sale di rocca (NaCl) si scioglie in acqua e che quindi con tali tipi di celle si possono usare solo solventi non acquosi, i quali devono essere privi di tracce di umidità.
In tutti i casi il solvente utilizzato per la preparazione del campione non deve assorbire ap-

prezzabilmente nella regione in cui si effettuano le misure. Per misure nel visibile non vi sono problemi poiché oltre all'acqua vi sono numerosi solventi incolori. L'acqua può essere utilizzata come solvente anche nell'ultravioletto; tra i solventi organici ve ne sono parecchi che possono essere impiegati. Nel caso di misure nell'infrarosso è più difficile trovare un solvente che sia completamente trasparente; tetracloruro di carbonio e solfuro di carbonio coprono la regione 2,5-15 mm. L'affidabilità dei risultati è strettamente legata ad un corretto impiego dell'apparecchio. Particolare attenzione va posta all'allineamento della lunghezza d'onda in mancanza del quale, se il valore della lunghezza d'onda di analisi è strettamente definito, si registrano considerevoli perdite di sensibilità. Per misure nel visibile tale allineamento può essere verificato con il doppio picco di una soluzione diluita di pergamanato che deve cadere a 526 e 546 nm o, nel caso di mezzo disperdente di peggiore qualità (reticolo invece del prisma), come una banda sola slargata compresa tra 535 e 550 nm.
Per misure nell'UV e nell'IR sono disponibili gli spettri di numerose sostanze organiche con le quali è pertanto possibile, impiegandole come riferimento, verificare l'allineamento suddetto. In particolare nell'IR controlli accurati possono eseguirsi operando con stirene o altre plastiche trasparenti. Sebbene molti apparecchi siano stabilizzati è opportuno adottare dispositivi di trasformazione e stabilizzazione della tensione di rete soprattutto nel caso di apparecchi all'interno di grosse strutture industriali dove si abbiano forti assorbimenti di corrente elettrica. L'instabilità dell'alimentazione si trasforma in gravi incertezze di azzeramento.

3.6 Assorbimento atomico

3.6.1 Assorbimento atomico in fiamma

Lo stadio più difficile nei processi di assorbimento atomico è certamente rappresentato dalla conversione del metallo dallo stato ionico o molecolare allo stato atomico. Ciò viene realizzato nel bruciatore. Esistono sostanzialmente due differenti tipi di bruciatore: il bruciatore a consumo totale ed il bruciatore a flusso laminare o con camera di premiscelazione. Nel primo il gas combustibile ed il gas ossidante (di supporto) vengono mescolati e bruciati in corrispondenza della punta del bruciatore. Il campione è aspirato nella fiamma per "effetto Venturi" dal gas di supporto. Nel secondo tipo il gas combustibile e quello di supporto vengono mescolati in una camera prima di entrare nella testa del bruciatore. Anche in questo caso il campione viene aspirato per "effetto Venturi" attraverso un capillare usando per l'aspirazione il gas di supporto. Generalmente tutti i tipi di bruciatore consentono degli aggiustamenti rotazionali e verticali per scegliere l'area di assorbimento più sensibile della fiamma in relazione all'elemento in esame. L'aggiustamento verticale è probabilmente quello che conta di più nel passaggio da un elemento ad un altro.
Il sistema di atomizzazione con fiamma (aria-acetilene, aria-protossido d'azoto con i quali si raggiungono temperature, rispettivamente, di 2200°C e 2600°C, sufficienti per la formazione di un vapore atomico) può essere vantaggiosamente sostituito da quello che impiega un fornetto di grafite (3.6.2). Lo schema di un apparecchio per assorbimento atomico in fiamma è riportato in Fig. 2.

3.6.2 Assorbimento atomico mediante atomizzazione elettrotermica

Per eseguire misure di assorbimento atomico allo scopo di determinare la concentrazione di un elemento è necessario disporre di: una sorgente che emetta la radiazione di risonanza dell'elemento, un dispositivo per polverizzare e vaporizzare la soluzione, uno spettrofotometro per isolare la radiazione di risonanza assorbita e per misurare l'intensità prima e dopo il passaggio attraverso il vapore atomico.
La sorgente di emissione più comunemente impiegata è la lampada a catodo cavo, un'ampolla di vetro, internamente speculare, all'interno della quale si provoca una scarica elettrica in atmosfera di gas rarefatto (2-3 mm di Hg) mediante due elettrodi (un anodo costituito generalmente da una bacchetta di tungsteno ed un catodo costituito da un cilindretto cavo del metallo che interessa determinare) fra i quali si stabilisce una differenza di potenziale di qualche centinaio di volts di corrente continua livellata. Lo spettro emesso dipende dal potenziale

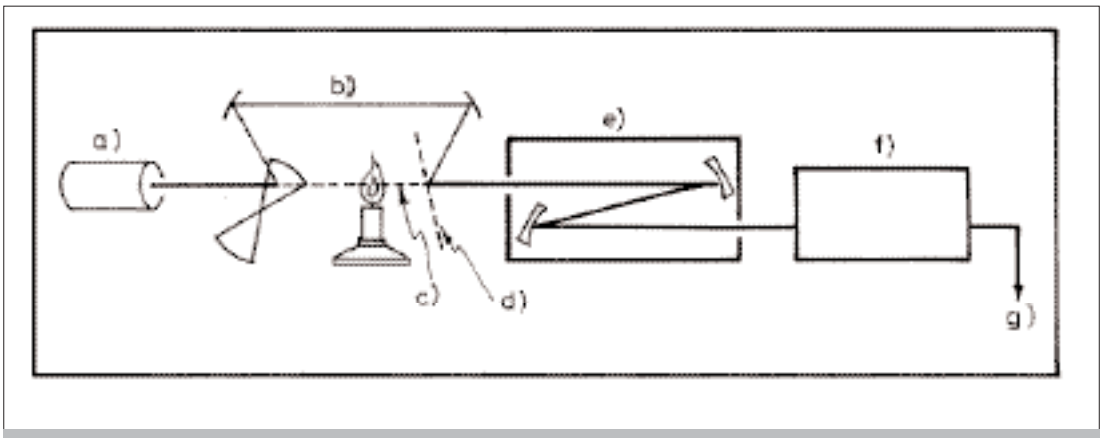


Figura 2: Schema di spettrofotometro per assorbimento atomico. a = sorgente; b = raggio di riferimento; c = raggio campione; d = specchio; e = fotomoltiplicatore; f = rivelatore; g = uscita per il registratore.

di eccitazione del gas raro (argon, elio) presente nell'ampolla. Per ogni elemento da determinare è quindi necessaria una lampada diversa.
Alcuni strumenti realizzano il cambio attraverso torrette, comandate elettronicamente, che ruotando permettono l'inserimento nel circuito ottico di una delle lampade (fino a sei) di cui dispongono. Altri strumenti portano una lampada alla volta e richiedono quindi un rimpiazzo manuale tutte le volte che è richiesta l'analisi di più elementi. In quest'ultimo caso il sistema elettronico è ovviamente da preferirsi; altrimenti risulta poco conveniente. Per l'uso ottimale dello strumento sono necessarie alcune precisazioni.
Dopo che la lampada, adatta per l'analisi, è stata inserita nel circuito ottico la corrente del catodo cavo deve essere regolata al valore raccomandato dal costruttore dell'apparecchiatura ed il sistema deve essere lasciato stabilizzare elettronicamente (riscaldamento) prima dell'uso: un tempo di circa 15 minuti è sufficiente a tale scopo. Durante tale periodo il monocromatore può essere posizionato al valore di lunghezza d'onda corretta e può essere fissata la lunghezza della fenditura. Per gli strumenti a torretta multilampada la corrente di riscaldamento alimenta tutte le lampade; in caso di sostituzione della lampada di lavoro mediante rotazione della torretta, il tempo di riscaldamento nella nuova posizione può essere notevolmente ridotto. In uno strumento a lampada singola, l'instabilità rilevata durante il riscaldamento può essere ridotta mediante l'uso di un sistema ottico a doppio raggio.
Oltre alle lampade per singoli elementi sono disponibili in commercio lampade multielementi (fino a 6 elementi per lampada) che, montate su torretta comandata elettronicamente, estendono ad oltre 30 il numero degli elementi determinabili. Le lampade multielementi sono più economiche delle altre ma il risparmio può risultare fittizio in quanto durante l'uso tutti gli elementi presenti sul catodo si deteriorano a causa della volatilità relativa, a prescindere dall'elemento in analisi. Infatti i metalli più volatili volatilizzano più rapidamente degli altri e si depositano sul catodo aumentando l'area superficiale di quel metallo a danno di quello degli altri. Con l'uso prolungato si produce così una deriva di segnale, crescente per almeno un metallo, decrescente per gli altri.
L'intensità delle singole luci in questo caso è maggiore che quella della luce dello stesso elemento nel caso di emissione da lampada multielementi; ciò è dovuto al fatto che per questa l'energia di scarico deve essere divisa fra tutti gli elementi.
Il fattore di perdita di intensità non è comunque elevato: esso varia fra 1/2 e 1/6 è può essere del tutto compensato nel caso di lampade multielemento per le quali l'allineamento consente più alti valori della corrente di lavoro che, peraltro, deve essere sempre mantenuta al di sotto dei valori limite indicati dai produttori, se si vuole preservare la vita della lampada. La messa a punto di una lampada ad alta intensità ha permesso di fare coincidere esigenze di durata con esigenze di sensibilità. In condizioni normali si può senz'altro affermare che anche una lampada a catodo cavo può lavorare per alcuni anni purchè vengano rispettati i limiti di corrente e tensione operativi. L'indizio di una lampada deteriorata è rappresentato da un aumento del rumore di fondo e/o da una perdita di sensibilità.

I principali vantaggi di questo secondo sistema di atomizzazione senza fiamma, rispetto al precedente, sono:

- il limite di rivelabilità per la maggior parte degli elementi scende sino all'ordine di grandezza dei µg/L o delle frazioni di µg/L, e cioè circa 1000 volte inferiore rispetto alla fiamma;
- possibilità di analizzare campioni disponibili solo in piccoli volumi (con il fornetto sono sufficienti pochi microlitri di campione).

Accanto a tali vantaggi la tecnica con fornetto presenta anche alcuni svantaggi:

- un più lungo tempo di analisi rispetto alla fiamma (2-3 minuti per ogni singola determinazione contro 5-10 secondi per la fiamma);
- un maggiore errore sulle determinazioni: 8-10% contro 1'1-2% della fiamma.
- maggiori problemi di interferenze rispetto alla fiamma.

Le due tecniche risultano assolutamente complementari nell'analisi di metalli in matrici ambientali; laddove le concentrazioni attese per l'elemento in esame rendono possibile l'applicazione di entrambe le tecniche, è consigliabile l'utilizzo dell'assorbimento atomico in fiamma. L'assorbimento atomico mediante atomizzazione elettrotermica, per la sua maggiore sensibilità, può essere utilizzato nell'analisi diretta di metalli in tracce senza il ricorso ad onerose procedure di preconcentrazione del campione, come richiesto dall'analisi in fiamma.
Per quanto concerne le strumentazioni disponibili, esistono strumenti a doppio raggio ed a singolo raggio. Con strumenti a singolo raggio, il raggio luminoso della sorgente passa direttamente al rilevatore attraverso la fiamma. Negli strumenti a doppio raggio invece l'emissione della sorgente viene, mediante uno specchio, divisa in due parti di uguale intensità: di queste il raggio di riferimento va direttamente al rivelatore; l'altro, il raggio campione, passa attraverso la fiamma prima di essere confrontato con l'altro nel rilevatore, che nel caso di ineguaglianza, produce un segnale in corrente alternata, proporzionale allo sbilanciamento fra i due raggi, che viene amplificato e misurato.
Il vantaggio degli apparecchi a doppio raggio sta quindi nel fatto che ogni variazione della sorgente (e quindi dell'alimentazione) risulta ai fini della misura di nessuna importanza; l'unico inconveniente deriva dalla leggera perdita di energia raggiante per gli specchi accessori contenuti e dalla complessità più elevata del sistema ottico.
Gli strumenti a singolo raggio per contro hanno il vantaggio di consentire l'impiego di lampade a bassa intensità, di più piccole slitte porta campione e di essere caratterizzate da valori più piccoli del guadagno; di conseguenza se correttamente disegnato uno strumento di questo tipo può operare con un minore rumore di fondo, con miglior rapporto di intensità segnale/rumore e quindi con maggiore precisione e sensibilità. Poichè i sistemi ottici semplici conservano l'energia raggiante soprattutto alle lunghezze d'onda più basse, è in tale intervallo che questo tipo di strumento è particolarmente vantaggioso (cioè per elementi con linea di risonanza fino a 350-300 nm).

3.7 Analizzatore di carbonio

Un altro strumento di impiego comune e routinario, sempre più presente nei laboratori di analisi delle acque, è l'analizzatore del carbonio organico in cui il carbonio viene determinato come CO_2 in un rivelatore a termoconducibilità dopo combustione a 900°C del campione in corrente di ossigeno; i modelli più nuovi consentono una programmazione delle temperature di combustione in modo da distinguere fra carbonio totale e carbonio inorganico (il carbonio organico si ricava per differenza). In alcuni analizzatori il biossido di carbonio formatosi viene ridotto a ossido di carbonio determinabile mediante spettrofotometria nell'infrarosso; in altri si misura l'ossigeno consumato nella combustione: in questo caso però una certa incertezza deriva dalla non definita stechiometria di trasformazione di N e S nella combustione; in altri ancora il campione di acqua viene iniettato su un filo di palladio riscaldato, contenuto nella camera di combustione; in questo caso l'ossigeno derivante dalla decomposizione catalitica del-

l'acqua si combina con il carbonio producendo biossido di carbonio, che viene determinato. Nonostante le diverse soluzioni tecnologiche proposte il primo modello è ancora il più impiegato; per esso devono essere tuttavia adottate alcune precauzioni:

- tutto il carbonio presente nel campione come carbonato o bicarbonato deve essere rimosso prima dell'analisi o in alternativa si deve di esso tener conto nei calcoli;
- il materiale particellato nel campione non deve essere di dimensioni maggiori a quelle del foro dell'iniettore: se c'è questo rischio è bene ricorrere ad una preoperazione di omogeneizzazione per ridurre la dimensione delle particelle;
- lo strumento deve essere precondizionato con ripetute iniezioni di acqua distillata per ottenere condizioni operative stabili;
- la temperature del forno ed il flusso di ossigeno devono essere mantenuti ai corretti valori durante tutta l'esperienza;
- lo strumento deve subire periodiche operazioni di manutenzione soprattutto per quanto riguarda la sostituzione del riempimento del tubo di combustione (tale operazione risulta necessaria in presenza di perdita di sensibilità e di eccessiva larghezza dei picchi), la pulizia e l'asciugatura del microfiltro (il segnale è l'instabilità della linea di zero) e della cella per l'infrarosso (i segnali sono la perdita di sensibilità e un eccessivo rumore di fondo) ed infine il ricarico con azoto della cella di riferimento.

4. Reattivi: limiti di purezza e classificazione

La purezza dei reagenti chimici, richiesta nella chimica analitica, varia con il tipo di analisi. I parametri da misurare, la sensibilità e la specificità del sistema rivelatore, sono fattori importanti nel determinare il grado di purezza dei reattivi impiegati. Le indicazioni fornite sulle confezioni dei vari prodotti devono essere accuratamente confrontate con le esigenze del metodo. In commercio i prodotti chimici sono disponibili a diversi gradi di purezza. I prodotti tecnici o commerciali sono i meno puri, quelli di notevole purezza o esenti da determinate sostanze e che vengono impiegati per determinati tipi di analisi (reattivi per l'analisi cromatografica sia in fase liquida che gassosa, per l'analisi spettrografica, per l'analisi in assorbimento atomico, per la determinazione di pesticidi, radionuclidi, ecc.) sono messi in commercio dalle case produttrici con sigle particolari (RP reattivi puri, RS reattivi speciali, RE reattivi di grado industriale, ecc.) o con un certificato di garanzia. Alcune case produttrici pubblicano dei manuali con la descrizione di saggi di purezza da eseguire per i diversi prodotti. Il grado FU (o RPH) indica in Italia i prodotti chimici che soddisfano le esigenze della Farmacopea Ufficiale, mentre in America essi vengono indicati come USP (United States Pharmacopoeia).
Per molte analisi, quando non viene diversamente indicato, il grado analitico dei reattivi (le cui caratteristiche corrispondono a quelle stabilite dalle convenzioni internazionali, ed in particolare fissate dalla Commissione Analitica della American Chemical Society) è sufficiente. In ogni caso non devono mai impiegarsi reattivi di grado di purezza inferiore a quella richiesta. Qualora solventi o reattivi contengano sostanze che interferiscono con una particolare determinazione e non si riesca a reperire un prodotto idoneo, si può sottoporre il prodotto disponibile ed inadeguato a pretrattamenti che lo privino degli interferenti indesiderati. Le procedure per eliminare o minimizzare la presenza di dette impurezze, che producono interferenze specifiche o fondi molto elevati, variano con il tipo di reattivo e con il metodo di determinazione adottato. Le più comuni sono:

- il lavaggio dei reattivi inorganici con i solventi organici con i quali i reagenti stessi vengono in contatto nell'analisi;
- il lavaggio degli adsorbenti cromatografici con i solventi opportuni e la loro riattivazione termica (≅ a 60°C);
- la pre-estrazione dell'acqua distillata e delle soluzioni acquose dei reattivi con i solventi organici impiegati in una particolare analisi;

- la ridistillazione dei solventi impiegati;
- la ricristallizzazione dei reattivi e dei coloranti impiegati nelle determinazioni colorimetriche e cromatografiche su strato sottile.

Anche in questo caso vengono fornite indicazioni specifiche per i vari tipi di analisi.
Nel caso dell'analisi inorganica generalmente da reattivi e solventi non derivano problemi di interferenza, tuttavia in alcuni casi specifici sono richieste particolari proprietà: così, ad esempio, il persolfato di potassio, impiegato per la determinazione di fosforo ed azoto, deve essere spesso purificato da ammoniaca in esso contenuta, operazione che viene realizzata mediante passaggio di aria attraverso una soluzione riscaldata del reattivo; il reattivo viene recuperato per successiva ricristallizzazione.
Per l'analisi radiologica, è necessario disporre di reattivi di particolare purezza; in qualche caso (per esempio il solfato di bario impiegato per la coprecipitazione del radio) è necessario ricorrere a ripetute operazioni di ricristallizzazione per rimuovere fondi persistenti radioattivi (il radio nell'esempio suddetto). In alcuni casi i solventi che non rispondono alle esigenze di purezza possono essere distillati per accrescerne il grado di purezza. I gas generalmente vengono invecchiati, per quasi 30 giorni, per ridurne il fondo radioattivo; se ciò non si ottiene è necessario sostituirli con prodotti radiologicamente più puri.
Nel caso dell'analisi organica molti reattivi e solventi AR non soddisfano le esigenze di questo tipo di determinazione. Impurezze, considerate insignificanti o in traccia per molti scopi analitici, sono presenti, talvolta, in concentrazioni molto più elevate di quelle delle sostanze organiche da determinare, cosicchè, anche in relazione alle operazioni di preconcentrazione che spesso vengono eseguite, finiscono per costituire interferenze anche pesanti per i metodi di analisi organica. È necessario, pertanto, ricorrere ad operazioni di purificazione mediante lavaggio dei reattivi organici con tutti i solventi con i quali verranno a contatto durante l'analisi, lavaggio degli adsorbenti cromatografici con i solventi impiegati per una specifica colonna o per uno specifico procedimento cromatografico su strato sottile, pre-estrazione dell'acqua distillata con i solventi impiegati nell'analisi, pre-estrazione delle soluzioni acquose dei reattivi con i solventi impiegati nell'analisi, ridistillazione dei solventi in sistemi "tutti in vetro" impiegando un'efficiente colonna di frazionamento, ricristallizzazione dei reattivi e dei coloranti impiegati nell'analisi colorimetrica o cromatografica su strato sottile.
La qualità dei gas, richiesta per l'analisi organica, è sostanzialmente quella necessaria per la gascromatografia, quindi dipenderà dal tipo di rivelatore impiegato. Generalmente i gas compressi sono di grado secco prepurificato. A seconda della natura esistono differenti denominazioni di gas compressi di soddisfacente prestazione. Sui gas di combustione in particolare, ma sarebbe opportuno estendere l'accorgimento a tutti gli altri, è bene prima del loro impiego procedere ad operazioni di filtrazione e di essiccamento su filtri e colonne appositamente predisposti; gas sporchi di qualità inferiore al richiesto, sono particolarmente dannosi ai fini della qualità analitica dei risultati in analisi organica. Infatti essi possono portare ad una diminuzione della sensibilità del rivelatore e produrre un'instabile linea di zero o un elevato rumore di fondo. Tali inconvenienti si possono verificare nel caso in cui si operi con bombole troppo vuote: gli ultimi residui di gas contengono infatti spesso numerose impurezze. Per ridurre questo pericolo, tutte le bombole devono essere svuotate soltanto fino ad un certo limite non lasciando mai che la pressione cada sotto 100-200 psi (7-14 atm); è del tutto inutile pensare di operare fino a pressioni più basse evitando il rischio di contaminazione del rivelatore mediante l'ausilio di essiccatori a filtro.
Le bottiglie di vetro al borosilicato, con i tappi di vetro smerigliato, sono generalmente indicate per la conservazione della maggior parte delle soluzioni e dei solventi. Contenitori in plastica (polietilene, ad esempio) sono richiesti nel caso di soluzioni alcaline, a meno che non si stiano eseguendo determinazioni di composti di natura organica, nel qual caso i contenitori in plastica devono essere accuratamente evitati, come anche devono essere evitati quando non mantengano un volume costante, assorbano componenti di interesse e producano interferenze. È indispensabile che tutti i contenitori prima dell'uso siano accuratamente puliti e conservati. I reattivi ed i solventi devono essere sempre conservati secondo le indicazioni del produttore; nel caso di sensibilità alla luce la conservazione deve avvenire in bottiglie scure e in luogo buio.

Di particolare importanza è la conservazione in bottiglie scure di materiale impiegato in analisi radiologiche, dal momento che la fotoluminescenza produrrà un valore alto del fondo nel caso si impieghino contatori rivelatori fotosensibili.
Alcuni reattivi richiedono di essere conservati in frigorifero. I materiali adsorbenti per gascromatografia e cromatografia su strato sottile vengono conservati nei contenitori nei quali vengono forniti all'atto dell'acquisto o secondo le specifiche indicazioni fornite nello specifico metodo di analisi. Il carbone attivato, impiegato per preparare campioni per l'analisi organica, deve essere conservato e trattato in area protetta dall'atmosfera e da altre possibili fonti di contaminazione.
I materiali utilizzati per la taratura degli strumenti sono materiali di riferimento certificati costituiti da sostanze pure o miscele a composizione nota, a partire dalle quali vengono preparate soluzioni di riferimento o di taratura (chiamate anche soluzioni standard) a contenuto noto da utilizzare per le operazioni di taratura.
Le soluzioni di riferimento devono essere accuratamente registrate per tipo di composti, concentrazioni, solvente, data, nome del ricercatore che le ha preparate.
I materiali di riferimento certificati devono essere:

- ottenuti da sorgenti affidabili;
- accompagnati da un certificato in cui sono riportati tra l'altro la composizione del materiale, la riferibilità al Sistema internazionale delle unità di misura, il valore certificato della proprietà d'interesse, l'espressione della incertezza dei valori certificati.

Un ampio spettro di materiali di riferimento certificati sono disponibili da parte dell'Institute for Reference Material and Measurement (Geel-Belgio) e di numerose case produttrici.
L'analista deve portare particolare attenzione alla stabilità dei materiali di riferimento, che non devono essere mai impiegati oltre il tempo di scadenza suggerito dal produttore o dal metodo. Alcuni materiali di riferimento possono subire variazioni di concentrazione a causa dell'assorbimento di vapori d'acqua o di gas dall'aria. La concentrazione della soluzione di riferimento può variare per evaporazione del solvente, soprattutto se trattasi di solvente organico volatile, pertanto è necessario mantenere sempre chiuse le bottiglie aprendole soltanto per lo stretto tempo d'uso. In altri casi si possono produrre variazioni di composizione per l'alterazione che subiscono alcuni composti (per esempio la soluzione di salda d'amido, impiegata come indicatore di iodimetria, deve essere preparata al momento dell'uso oppure preservata mediante conservazione in frigorifero o per aggiunte di cloruro di zinco o altri opportuni conservanti).
La prima fase che l'analista deve intraprendere nel condurre un'analisi è quella della determinazione del fondo o del bianco di ciascuno dei reattivi e solventi impiegati. Le condizioni di determinazione del bianco devono essere esattamente le stesse di quelle adottate nell'analisi, compreso soprattutto il sistema di rivelazione. Il metodo deve in ogni caso essere testato con materiale di riferimento certificato, se disponibile in commercio.
Dopo avere determinato i "bianchi" di ciascun reattivo, l'analista deve provvedere alla determinazione del bianco dell'intero metodo al fine di verificare se esistono interferenze sinergiche con l'analisi. Il bianco del metodo è determinato seguendo il procedimento in ogni suo stadio, soprattutto impiegando le quantità di ogni reattivo e solvente descritte nel metodo. Se il bianco completo interferisce con la determinazione è necessario introdurre una fase volta ad eliminare o ridurre l'interferenza ad un livello accettabile e, nel caso in cui ciò non possa essere realizzato, bisognerà tener conto del valore del bianco al momento del calcolo della concentrazione dello specifico costituente analizzato all'interno del campione.

5. Vetreria

La determinazione degli inquinanti in traccia, presenti nelle acque, richiede metodi capaci della massima sensibilità. Questo è particolarmente vero nel caso di analisi di metalli, di sostanze organiche come i pesticidi, di ammoniaca e del fosforo. Oltre a metodi sensibili esistono numerosi altri accorgimenti da adottare, primo fra tutti quello della pulizia della vetreria di laboratorio.

Ovviamente i sistemi analitici molto sensibili sono i più influenzati da eventuali errori che derivano da una scelta o da un utilizzo improprio dell'apparecchiatura sperimentale, come anche da effetti di contaminazione dovuti a non adeguate operazioni di pulizia. Lo scopo di questo capitolo è quello di discutere i differenti tipi di vetreria disponibile, l'uso dei contenitori a volume, le esigenze ed i metodi di pulizia.

5.1 Tipi di vetreria

I recipienti che possono essere usati in laboratorio, debbono soddisfare tre esigenze fondamentali: la conservazione dei reattivi, la misura esatta di volumi di soluzioni e l'attuazione delle reazioni. Il vetro è il materiale di più comune utilizzazione, tuttavia, per motivi particolari, possono essere impiegati materiali come porcellana, nichel, ferro, alluminio, platino, acciaio inossidabile e plastica.
Vi sono molti tipi di vetro da quelli più semplici a quelli che possiedono proprietà specifiche come la resistenza allo "shock" termico, il basso contenuto di boro, ecc.. Esistono anche recipienti di vetro "morbido" i quali possono essere utilizzati soltanto per esigenze specifiche e, in particolare, sono da evitare per la conservazione dei reattivi. Il materiale da utilizzare in un laboratorio analitico moderno è il vetro borosilicato altamente resistente, come quelli che vanno sotto la denominazione di "Pyrex" e "Kimax". Quando non è specificato diversamente, questi tipi di vetro risultano soddisfacenti per tutte le determinazioni incluse in questi volumi.
Tra i vari materiali impiegati comunemente per differenti scopi possono essere ricordati i seguenti:

- Kimax o Pyrex: questo tipo di vetro al borosilicato è relativamente inerte e utilizzabile per la quasi generalità degli scopi.
- Vycor: è un vetro di silice, adatto per sopportare temperature fino a 800°C. Può anche essere immerso in ghiaccio senza scompensi.
- Corning: è 50 volte più resistente agli alcali della vetreria convenzionale ed è particolarmente esente da boro.
- Ray-Sorb o Low-Actinic: è usato per la conservazione o manipolazione di sostanze sensibili alla luce.
- Corex: è più resistente dei borosilicati convenzionali e più adatto a resistere allo sfregamento.

L'impiego di recipienti di plastica, di contenitori e altre apparecchiature fatte di teflon, polietilene, polipropilene e polistirene è cresciuto notevolmente negli ultimi anni. Alcuni di questi materiali, come il teflon, sono piuttosto costosi; d'altra parte i rubinetti di teflon hanno rimpiazzato quelli di vetro nelle burette e negli imbuti separatori dal momento che possono essere evitate le operazioni di lubrificazione che sarebbero necessarie nei rubinetti di vetro.
Alcuni aspetti da considerare nella scelta del materiale sono i seguenti:

- come è stato già detto, il vetro al borosilicato è adatto per la generalità delle determinazioni analitiche ad eccezione dei casi appositamente indicati. I tipi speciali di vetro, riportati sopra, rientrano tra i casi non routinari;
- a meno che non sia indicato diversamente, bottiglie di borosilicato o polietilene debbono essere usate per la conservazione dei reattivi e delle soluzioni di riferimento;
- alcuni metalli possono depositarsi sulle pareti di vetro dei contenitori durante un lungo periodo di conservazione in soluzione diluita. Tali soluzioni debbono essere preparate al momento dell'uso;
- bottiglie di polietilene e/o teflon sono risultate soddisfacenti per la raccolta e il trasporto di campioni d'acqua. Acidi minerali forti e solventi organici possono attaccare il polietilene e debbono essere evitati;
- la vetreria in borosilicato non è completamente inerte, per tale motivo gli alcali, le soluzioni di riferimento di silice, di boro e dei metalli alcalini devono essere conservate in recipienti di plastica.

5.2 Vetreria volumetrica

La vetreria tarata accuratamente e adibita a misure di volume è denominata "vetreria volumetrica" e include matracci, pipette e burette tarati. Altri tipi di vetreria come i cilindri e le pipette graduate possono essere utilizzate quando la misura esatta non è necessaria.
La precisione e l'accuratezza della determinazione volumetrica dipendono dalla concentrazione delle sostanze da determinare. In ogni caso vi sono certe sorgenti di errore da considerare.
In primo luogo le letture debbono essere effettuate correttamente operando nel modo seguente:

- il segno di taratura deve essere tangente al fondo del menisco del liquido;
- cambiamenti di temperatura possono provocare un cambiamento dell'effettiva capacità del contenitore e quindi del volume di soluzione ivi contenuto, quindi le soluzioni debbono essere misurate alla temperatura indicata sulla vetreria.

Le apparecchiature volumetriche possono essere di due tipi:

- apparecchiature tarate TC ("to contain") come ad esempio matracci tarati;
- apparecchiature tarate TD ("to deliver") come le burette e le pipette tarate.

I matracci tarati sono generalmente disponibili in dimensioni da 1-2000 mL di capacità.
Le pipette tarate sono destinate al rilascio di un volume prefissato; in genere sono utilizzate quelle da 1 a 100 mL. Nell'operazione di rilascio della soluzione le pipette devono essere tenute in posizione verticale, la punta deve essere posta in contatto con la parete del contenitore per un secondo o due dopo che il flusso è stato interrotto. Il liquido rimanente non deve essere assolutamente rimosso.
Le burette sono usate per il rilascio di un volume definito; le più comuni sono da 25-50 mL di capacità, graduate in divisioni di un millilitro. Esistono anche microburette da 5-10 mL graduate in divisione fino a 0,01 mL e burette automatiche da 10-100 mL con serbatoi della capacità da 100 a 400 mL.
Le regole da seguire nell'impiego delle burette sono le seguenti:

- non utilizzare la buretta secca o appena pulita per l'uso, ma sciacquare due o tre volte la medesima con piccoli volumi della soluzione con cui deve essere riempita;
- non lasciare nella buretta soluzioni alcaline che possono attaccare il vetro;
- la velocità di uscita del flusso in una buretta da 50 mL non deve superare i 0,7 mL/sec, altrimenti si corre il rischio, lasciando indietro troppo liquido attaccato alle pareti della buretta, di introdurre vistosi errori.

5.3 Lavaggio della vetreria

I sistemi di lavaggio hanno il duplice scopo di eliminare le sostanze estranee, che devono essere rimosse, e di consentire l'effettuazione delle determinazioni in condizioni ottimali.
Per l'eliminazione delle sostanze solubili sono sufficienti lavaggi con acqua calda o fredda ed il risciacquo finale con piccole porzioni di acqua distillata.
Altre sostanze, più difficili da rimuovere, possono essere eliminate usando detergenti alcalini esenti da fosfati e solventi organici. In tutti i casi dopo l'uso è opportuno, in via preliminare, sciacquare abbondantemente ogni recipiente con acqua di rubinetto, dal momento che il materiale secco sulle pareti della vetreria è più difficile da asportare.
La vetreria tarata (in particolar modo le burette) deve essere lavata con una soluzione preparata ponendo in 1 litro di acqua distillata 30 g di idrossido di sodio e 8 g di fosfato trisodico (1-2 g di laurilsolfato di sodio, o di altro tensioattivo, in alcuni casi incrementa il potere lavante).
La miscela cromica è un agente lavante molto energico; d'altra parte, proprio a causa della sua

aggressività, si consiglia di operare in laboratorio con estrema cautela. Tale miscela può essere preparata aggiungendo lentamente e agitando, 1 L di acido solforico concentrato a 35 mL di soluzione satura di dicromato di sodio. Questa miscela deve essere tenuta almeno 15 minuti nel recipiente che deve essere lavato. Quest'ultimo, dopo che la miscela cromica è stata recuperata, va sciacquato ripetutamente con acqua di rubinetto e alla fine con acqua distillata.
L'acido nitrico fumante agisce più rapidamente ma è d'impiego meno pratico. La miscela acido solforico concentrato-acido nitrico fumante è ancora più efficiente, ma anche più pericolosa.
Persistenti strati di grasso possono essere eliminati trattando con acetone o con una soluzione calda di idrossido di sodio (1 g/50 mL H_2O); dopo aver sciacquato con acqua, si tratta con acido cloridrico diluito, quindi nuovamente con acqua distillata. Allo stesso scopo può essere utilizzata una soluzione alcoolica di idrossido di potassio.
Le celle di assorbimento usate in spettrofotometria devono essere pulite scrupolosamente. Possono essere lavate con detergenti o con solventi organici per rimuovere residui organici. Possono essere anche effettuati lavaggi con soluzioni diluite di acido nitrico; invece è sconsigliato l'impiego del dicromato di potassio a causa del suo possibile adsorbimento sul vetro. Le celle debbono essere quindi sciacquate con acqua distillata e poi con alcool.
Per certe determinazioni, ad esempio per metalli in tracce, la vetreria dovrebbe essere sciacquata con una soluzione acido nitrico-acqua 1+1, risciacquata più volte con acqua di rubinetto e quindi con acqua distillata.
La vetreria da usare per la determinazione di fosfati non deve essere lavata con detergenti contenenti queste sostanze. Detta vetreria deve essere sciacquata con acqua di rubinetto e poi con acqua distillata. Per la determinazione dell'ammoniaca e dell'azoto secondo Kjeldahl, la vetreria deve essere sciacquata con acqua esente d'ammoniaca.
La vetreria da utilizzare nella determinazione di microinquinanti organici in tracce (come pesticidi clorurati, PCB, PCT, pesticidi organofosforici, ecc.) deve essere priva di questi contaminanti. Un lavaggio con miscela cromica per 15 minuti è indispensabile per distruggere questi residui organici. Occorre quindi sciacquare abbondantemente con acqua di rubinetto e poi con acqua distillata. Se la vetreria deve essere utilizzata immediatamente essa può essere asciugata rapidamente usando alcool etilico seguito da acetone bidistillato (altrimenti può essere asciugata in stufa). Appena asciutta, la vetreria deve essere coperta con un foglio di alluminio sull'apertura per evitare l'ingresso di polvere.
Le bottiglie da utilizzare per la raccolta dei campioni e per l'analisi organica dovrebbero essere lavate con miscela cromica, poi con acqua di rubinetto, quindi con acqua distillata e infine alcune volte con un appropriato solvente.
Le capsule e i crogioli debbono essere lavati con detergenti, sciacquati con acqua di rubinetto, con acqua distillata e infine con solvente.

5.4 Vetreria da scartare

Quando il rischio nel lavaggio della vetreria per il riuso diventa troppo grande, come nel caso dell'uso di sostanze molto tossiche, può essere necessario gettare via la vetreria utilizzata. Esistono in commercio vari tipi di vetreria da scartare (includendo in essa pipette per determinazioni batteriologiche e sierologiche) costituita in genere di materiale di vetro morbido.

5.5 Vetreria specialistica

L'uso di recipienti e vetreria con giunti conici, sferici, ecc. offre notevoli vantaggi, come il risparmio di tempo e soprattutto la minor rigidità del sistema (assemblaggio apparecchi). Per questo particolare tipo di vetreria esiste la possibilità di classificazione e standardizzazione, come indicato nel seguito.

5.5.1 Giunti conici standard

$\frac{T}{S}$ è il simbolo usato per indicare i giunti intercambiabili, i tappi e i rubinetti in accordo con le prescrizioni degli Standards. Nel seguito sono indicati i differenti tipi di vetreria:

- per i giunti conici vengono indicati due numeri come $^{T}_{S}$24/30. 24 indica il diametro (in mm) della parte finale larga del giunto e 30 la lunghezza assiale dello stesso (anche in mm);
- per i tappi del rubinetto è indicato un solo numero come ad esempio $^{T}_{S}$2; che indica il diametro (in mm) del buco (o dei buchi) attraverso il tappo;
- per la bottiglia viene indicato un solo numero, ad esempio $^{T}_{S}$19; che indica il diametro (in mm) della sommità del collo della bottiglia;
- per i matracci viene indicato un solo numero, ad esempio $^{T}_{S}$19; che indica il diametro in (mm) dell'apertura della sommità del collo del matraccio.

5.5.2 Giunti sferici

$^{S}_{J}$ è la simbologia adottata per definire i giunti sferici in accordo con quanto previsto dal National Bureau of Standards. La simbologia indica due numeri, come ad esempio $^{S}_{J}$12/2; 12 è il diametro (in mm) della sfera e 2 il diametro della base del buco (anch'esso in mm).

5.5.3 Prodotti standard

$^{P}_{S}$ è il simbolo dei prodotti standard utilizzati per rubinetti con tappo in teflon. I prodotti standard sono caratterizzati da un solo numero come ad esempio $^{P}_{S}$ 2; che sta ad indicare un tappo di teflon con un buco di circa 2 mm.

5.6 Vetreria sinterizzata

Per certe operazioni di laboratorio, come la filtrazione, può essere necessario utilizzare vetreria sinterizzata (vedi, ad esempio, la determinazione dei solidi sospesi e dei solidi disciolti totali). Esistono almeno sei differenti tipi di porosità, come riportato in Tab. 6.

Tabella 6: Porosità della vetreria sinterizzata

Grado di porosità	Simbolo	Dimensione dei pori	Operazioni principali
Extra grossolano	EC	170-220	Filtrazione grossolana Dispersione di gas, lavaggio, assorbimento
Grossolano	C	40-60	Filtrazione grossolana Dispersione di gas, lavaggio, assorbimento
Medio	M	10-15	Filtrazione ed estrazione
Fino	F	4-5,5	Filtrazione ed estrazione
Veramente fino	VF	2-2,5	Filtrazione batteriologica generale
Ultra fino	UF	0,9-1,4	Filtrazione batteriologica generale

5.7 Lavaggio dei filtri

In molti casi i precipitati possono essere rimossi sciacquando semplicemente con acqua; altre volte può essere necessario un trattamento particolare. La Tab. 7 fornisce indicazioni sulle modalità di rimozione di alcune sostanze dai filtri.

Tabella 7: Pulizia dei filtri

Materiale	Agente lavante
Albume	Acido fluoridrico al 2% seguito da acido solforico concentrato. Sciacquare quindi con acqua fino a pH neutro
Ossidi di rame o di ferro	Acido cloridrico caldo più clorato di potassio
Grassi	Tetracloruro di carbonio
Solfuro di mercurio	Acqua regia calda
Sostanze organiche	Acido solforico concentrato caldo con qualche goccia di nitrito di sodio

BIBLIOGRAFIA

UNICHIM (2002): *"Guida alla scelta e all'uso dei materiali di riferimento"*, Unichim (Milano).

1020. Lineamenti di tecniche analitiche

L'analisi chimica può essere definita come quell'insieme di operazioni volte a mettere in evidenza gli elementi che costituiscono un composto o una miscela di composti. Generalmente essa viene distinta in analisi qualitativa e analisi quantitativa: la prima ha il solo scopo di identificare i componenti del campione da analizzare, la seconda si propone di determinare le proporzioni in cui tali componenti sono presenti.
Perché un fenomeno chimico possa essere utilizzato quale reazione analitica, devono essere soddisfatte tre condizioni: esso deve essere caratteristico (precipitazione, solubilizzazione, comparsa o scomparsa di un colore, svolgimento di un gas), specifico – legato cioè alla capacità di evidenziare una sola specie –, sensibile, cioè deve essere rilevabile anche per le quantità di sostanza che debbono essere determinate. La prima e la terza condizione sono più o meno spesso soddisfatte, la seconda invece, cioè la specificità, è relativamente rara.
Per rimediare a tale stato di cose si fa ricorso alle separazioni. Con tale operazione si intende l'utilizzazione di reattivi generali, che permettono di isolare un certo numero di elementi, comunemente detto "gruppo" prima di effettuare i saggi di identificazione.
Nel caso dell'analisi quantitativa è necessario conoscere anche con esattezza l'equazione stechiometrica e la composizione dei prodotti ottenuti.
L'analisi quantitativa comprende diversi metodi che possono essere distinti in tre categorie: metodi gravimetrici, metodi volumetrici, metodi chimico-fisici. Ad ogni metodo compete un particolare intervallo ottimale di concentrazione dell'elemento o della sostanza da analizzare.
Pertanto la scelta di un metodo è anche funzione dell'ordine di grandezza della concentrazione dell'analita da determinare.
Teoricamente è possibile ricondurre qualunque concentrazione nell'ordine di grandezza desiderato mediante operazioni di concentrazione per evaporazione del solvente (il che in pratica non si fa mai) o di diluizione (comunemente impiegata).
Nell'analisi gravimetrica la sostanza da analizzare viene precipitata quantitativamente con un eccesso di reattivo di concentrazione sconosciuta o conosciuta soltanto approssimativamente e dopo filtrazione e lavaggio il precipitato viene pesato.
Nell'analisi volumetrica la sostanza da analizzare viene trattata con un volume misurato di reattivo avente una concentrazione perfettamente conosciuta e dal volume adoperato si calcola la quantità della sostanza che si vuole determinare.
I metodi chimico-fisici di analisi quantitativa si basano sulla misura di certe grandezze fisiche dal cui valore si può risalire alla concentrazione di quelle specie che sono caratterizzate da tali grandezze.

1. Metodi gravimetrici

La base dell'analisi gravimetrica è la precipitazione. In tale operazione la sostanza da determinare viene trasformata in un composto di solubilità cosi piccola da poter essere separato per filtrazione in modo praticamente totale.
Nella estrema semplicità concettuale del metodo sta il suo principale vantaggio; conseguentemente risulta assai facile valutare l'accuratezza e l'affidabilità dei risultati ottenuti.
Contrastano con tale vantaggio alcuni grossi svantaggi e precisamente la scarsa selettività, che obbliga spesso a faticose separazioni prima di effettuare la determinazione gravimetrica, la purezza del precipitato che non raggiunge quasi mai limiti elevati se non si opera in condizioni sperimentali particolarmente controllate, la igroscopicità del precipitato, la non stechiometricità del composto formatosi per un eccesso dell'anione o del catione nella massa precipitata.

Quest'ultimo inconveniente può essere superato con abbondanti lavaggi a patto però che ciò non comporti parziali dissoluzioni.
A parte questi svantaggi le analisi gravimetriche richiedono una tecnica accurata e rifinita ed una notevole abilità operativa, al fine di evitare, durante lo sviluppo dell'analisi, che si abbiano perdite parziali del precipitato. Inoltre i lavaggi ripetuti, il recupero del precipitato, la pesata ripetuta più volte appesantiscono il metodo rendendolo esasperatamente lungo e noioso.
Lo strumento base dell'analisi gravimetrica è la bilancia.
Alcuni avvertimenti debbono essere tenuti presenti nell'uso della bilancia:

- la bilancia ed i pesi non devono essere esposti a fumi acidi e quindi si eviti di tenerli nel laboratorio;
- la bilancia deve essere tenuta in una custodia di vetro contenente un assorbente dell'umidità, poggiata su un piano non soggetto a vibrazioni;
- le sostanze volatili devono essere pesate in recipienti accuratamente sigillati;
- lo stesso accorgimento vale per le sostanze aggressive e corrodenti e per quelle igroscopiche;
- sulla bilancia non devono essere mai posti crogioli o altri recipienti ancora caldi;
- l'operazione di caricamento della bilancia con i pesi e con le sostanze da pesare deve essere eseguita mantenendo bloccata la bilancia.

I metodi gravimetrici sono sempre meno utilizzati nei laboratori di analisi ed anche nel presente manuale essi trovano scarsa applicazione, essendo ad essi preferiti i metodi volumetrici e quelli chimico-fisici.

2. Metodi volumetrici

La volumetria si basa sull'impiego di soluzioni a titolo noto che vengono aggiunte, sotto forma di piccole frazioni volumetriche successive e note, alla soluzione che contiene la specie che si vuole dosare.
Il punto finale della titolazione, dal quale perciò è possibile, sulla base della conoscenza della concentrazione della soluzione titolante, ricavare la concentrazione della soluzione titolata, viene messo in evidenza dalla variazione di colore che subisce un indicatore aggiunto a tale fine alla soluzione.
I principali metodi volumetrici sono:

- l'alcali-acidimetria;
- le titolazioni di ossido-riduzione;
- le titolazioni per precipitazione;
- le titolazioni complessonometriche.

L'alcali-acidimetria è basata sulla equazione di neutralizzazione

$$H^+ + OH^- \rightleftarrows H_2O$$

Essa consente di dosare gli acidi, le basi ed i sali di acidi forti e basi deboli o di basi forti ed acidi deboli.
Le titolazioni di ossidoriduzione si basano su una reazione del tipo

$$OX_1 + Rid_2 \rightleftarrows OX_2 + Rid_1$$

nella quale cioè la forma ridotta della coppia 2 agisce da riducente nei confronti della forma ossidata della coppia 1 con formazione della forma ossidata della coppia 2 e della forma ridotta della coppia 1.
I metodi per precipitazione e complessonometrici, infine, sono basati sulla formazione rispettivamente di composti molto poco solubili e di complessi molto stabili, generalmente chelati.

La bontà dei risultati ottenuti applicando tali metodi dipende dal valore del prodotto di solubilità del composto che si ottiene nella reazione e dalla precisione con cui si può determinare la fine della reazione.

2.1 Recipienti di misura

I recipienti comunemente impiegati nell'analisi volumetrica sono:

a) Palloni tarati: sono palloni a collo lungo e sottile, con un segno sul collo; servono a preparare soluzioni titolate e a portare a volume una quantità qualunque di liquido.
b) Cilindri graduati: sono cilindri divisi in centimetri cubici che servono solo per misure grossolane (Fig. 1).
c) Burette: sono tubi divisi in centimetri cubici e frazioni, chiusi inferiormente con un rubinetto di vetro (Fig. 1).

Nei palloni e nelle pipette (vedi sotto) le marche sono segnate su tutta la circonferenza del tubo, in modo che sia possibile fissare con esattezza la posizione del punto più basso del menisco, nelle burette che pur sono lo strumento volumetrico più importante, i segni ordinariamente sono limitati ad una parte del tubo.
Poichè con ciò la lettura diventa insicura o più difficile, si è cercato di ovviare agli errori di parallasse od almeno di diminuirli con disposizioni speciali, come ad esempio la striscia colorata sul fondo bianco proposta da Schellbach.
La commissione tedesca per gli apparecchi graduati dà i seguenti dati sulle tolleranze delle burette (Tab. 1).

Tabella 1: Errori permessi nelle burette secondo la Commissione tedesca

Capacità (mL)	100	75	50	25	10	2
Errore (mL)	0,08	0,06	0,04	0,03	0,02	0,008

Pipette: si distinguono le pipette a volume e le pipette graduate. Le pipette a volume possono avere un unico segno o un segno inferiore e uno superiore e servono a misurare un volume determinato di liquido. Le pipette graduate sono tubi fatti a guisa di buretta, divisi in centimetri cubici, tirati all'estremità inferiore in una punta sottile, come le pipette a volume.

La commissione tedesca indica per le pipette a volume le seguenti tolleranze (Tab. 2).

Tabella 2: Errori permessi, nelle pipette a volume, in relazione alla capacità (‰)

Capacità (mL)	100	50	25	20	10	2	1
Errore (mL)	0,07	0,05	0,025	0,025	0,02	0,006	0,006
corrispondente a	0,7	1	1,0	1,25	2	3	6

È chiaro che col metodo volumetrico si possono ottenere risultati esatti solo quando i recipienti di misura sono tarati in modo esatto.
Quantunque oggi i recipienti di misura vengano per lo più costruiti con molta cura, tuttavia ogni analista dovrebbe controllarne l'esattezza mediante apposite esperienze o meglio ancora effettuare le tarature graduate.
Deve anche tenersi presente che in tutte le operazioni che prevedono l'utilizzazione di recipienti tarati è di fondamentale importanza il controllo della temperatura di esperienza a causa dei ben noti fenomeni di dilatazione termica.

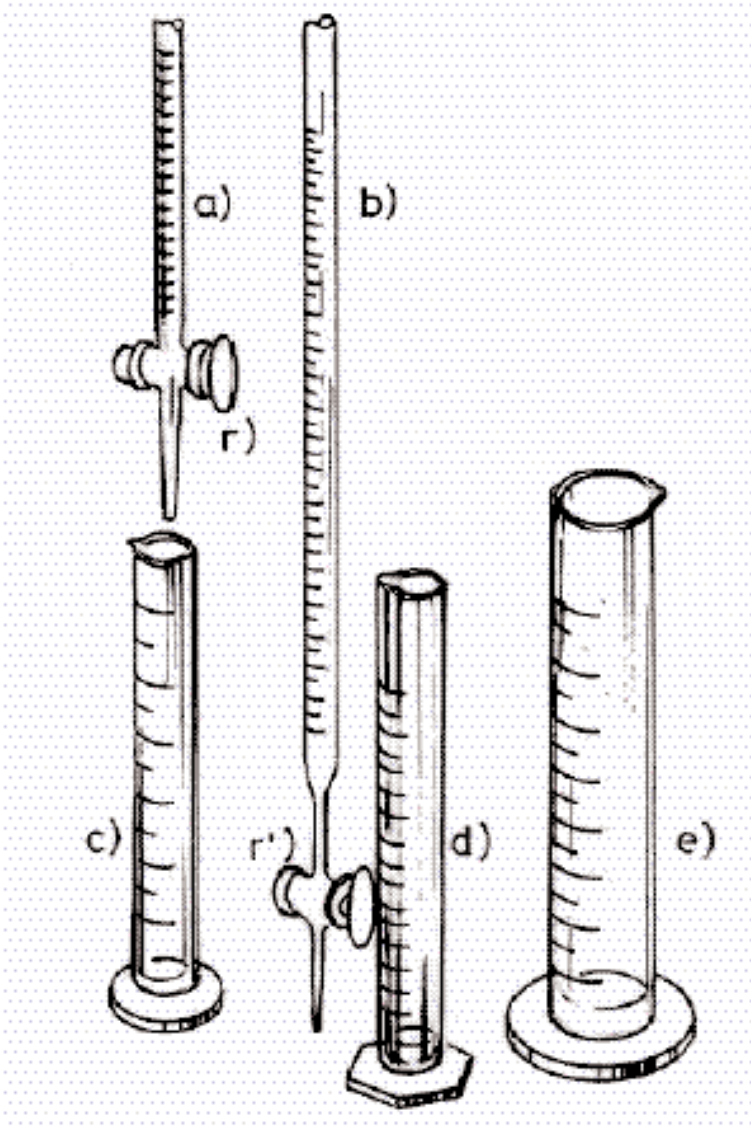


Figura 1: Burette (a,b) e cilindri (c,d,e), un esempio di vetreria tarata. I rubinetti (r, r') delle burette devono essere periodicamente ingrassati; inoltre, nel caso di soluzioni di alcali concentrati, il comune rubinetto a smeriglio non può essere adottato e deve essere sostituito da altri opportuni sistemi.

2.2 Soluzioni titolanti

Il titolo di tali soluzioni è comunemente espresso in normalità. Per soluzione normale si intende una soluzione che contiene disciolto per ogni litro un grammo equivalente della sostanza in questione. Poiché le soluzioni normali, per la maggior parte dei lavori analitici, sono troppo concentrate, si adoperano spesso soluzioni 0,5 - 0,2 - 0,1 - 0,05 - 0,01 normali e, in alcuni rari casi, 0,001 normali. Una soluzione 0,5 normale contiene mezzo grammo equivalente per litro, una soluzione 0,2 normale contiene un quinto del grammo equivalente per litro, ecc..
Il peso equivalente, ossia la quantità in grammi di soluzione da sciogliere in un litro per ottenere una soluzione normale, dipende, come è noto, oltre che dalla sostanza anche dalla particolare reazione alla quale essa prende parte.
La preparazione delle soluzioni titolanti viene eseguita in due tempi. Dopo aver preparato una soluzione a titolo approssimato (per pesata o per diluizione di una soluzione più concentrata) è necessario determinare con esattezza tale titolo, se si vuole impiegare la soluzione quale titolante in un'analisi volumetrica. Tale titolo può essere determinato ricorrendo a sostanze

madri o a soluzioni a titolo noto, avendo l'accorgimento di operare tale controllo in condizioni sperimentali che siano il più possibile simili a quelle in cui si esegue il dosaggio.
Si rilevi quanto sia importante e necessario che il peso della sostanza madre o il volume e la concentrazione della soluzione impiegata per il controllo siano determinati con rigorosa correttezza.

2.3 Reattivi chimici: limiti di purezza e classificazione

Nell'analisi chimica volumetrica basata, come si è detto, sul confronto fra i volumi e le concentrazioni del titolante o del titolato, è necessario disporre di soluzioni a concentrazione nota di opportuni reattivi chimici. Questi sono prodotti chimici ad alta purezza usati per scopo analitico e, in genere, per tutti quei lavori chimici dove le impurezze devono essere assenti o in concentrazioni note. Nel caso in cui non è conosciuta la concentrazione delle sostanze estranee, è indispensabile determinarne il contenuto.
In commercio i prodotti chimici sono disponibili a diversi gradi di purezza. I prodotti tecnici o commerciali sono i meno puri. Il grado FU indica in Italia i prodotti chimici che soddisfano le esigenze della Farmacopea ufficiale; in America si indicano con USP (United States Pharmacopoeia). I prodotti di notevole purezza usati nei laboratori sono messi in commercio dalle case produttrici con sigle particolari (per esempio RP, reattivi puri) o con un certificato di garanzia. Alcune case produttrici pubblicano dei manuali con la descrizione di saggi di purezza da eseguire per i diversi prodotti. Vi sono poi gruppi speciali di reattivi estremamente puri o esenti da determinate sostanze, che vengono usati per analisi particolari. Per molte analisi, tuttavia, risulta sufficiente il cosiddetto grado di purezza analitico.
In alcuni casi può essere utile effettuare un controllo del livello di purezza dichiarato dal produttore o ricorrere al lavaggio dei reattivi secondo le modalità indicate nella Sezione 1010 (Paragrafo 3).
Il contenitore dei reattivi chimici deve essere sempre accuratamente chiuso per evitare la contaminazione con polvere o altri prodotti diversi. Il prelievo deve essere effettuato versando il prodotto senza l'aiuto di cucchiai o spatole; per nessun motivo si deve rimettere del materiale nel recipiente.
I reattivi chimici sono spesso classificati in base alla loro utilizzazione pratica; in considerazione di ciò si possono avere reattivi di precipitazione, di ossidazione, di riduzione, ecc.. Si possono distinguere anche in reattivi generali quando il loro uso permette di caratterizzare una intera classe di composti, come gli acidi, le basi, i reattivi degli alcaloidi, dei grassi, ecc. e reattivi speciali, intesi come quelli che reagiscono con un solo composto o con un numero limitato di composti omologhi. Fra questi si annoverano quei reattivi organici o inorganici che formano, mediante legami coordinati, dei complessi con ioni inorganici, detti chelati, intensamente colorati e frequentemente insolubili in acqua, fatto che li rende molto utili nell'analisi chimica.
Poiché alcune delle determinazioni che si effettuano nell'analisi di un'acqua sono eseguite a valori di concentrazioni molto basse, è indispensabile scegliere con cura, oltre ai reattivi, anche l'acqua da impiegare nell'esecuzione dell'analisi. Per quanto riguarda quest'ultima, si sono adottati parecchi criteri per definire la purezza di un'acqua; due fra i più accettati sono riportati nella Sezione 1010 (Tab. 1-2).
Sostanzialmente è opportuno operare con acqua distillata e deionizzata (conducibilità=2 µS/cm) tenendo presente che anche la natura dell'apparecchio di distillazione (in vetro o in metallo) può influenzare la composizione del distillato:

distillatore in vetro:

Zn<1 µg/L; B=1,2 µg/L; Fe=1 µg/L; Mn<1µg/L; Al<5 µg/L; Cu=5 µg/L; Ni<2 µg/L; Pb<2 µg/L

distillatore in metallo:

Zn<9 µg/L; B=13 µg/L; Fe=2 µg/L; Mn<1 µg/L; Al<5 µg/L; Cu=11 µg/L; Ni<2 µg/L; Pb<26 µg/L

3. Metodi chimico-fisici

Le grandezze fisiche fondamentali che possono essere misurate direttamente sono in realtà non molte. La maggior parte delle misure che l'analista effettua in laboratorio consiste nel rilevare lo spostamento lineare od angolare di un certo indice su una scala. Così nell'impiego della buretta si registra la posizione iniziale e finale del menisco; in quello della bilancia il valore dei pesi tarati che dobbiamo aggiungere su uno dei due piatti per riportare a zero l'indice, nelle misure elettriche si misura lo spostamento angolare dell'ago dello strumento impiegato (amperometro, potenziometro, conduttimetro). Le apparecchiature più moderne, tuttavia, impiegano sistemi di rilevazione digitale.
Molte altre grandezze, come l'intensità della luce o del suono, possono essere sfruttate soltanto come indicatori di zero, nel senso che o il valore della grandezza o la differenza fra questo valore ed un altro assunto come riferimento sono nulli quando si porta l'indice della scala dell'apparecchio sul valore che spetta alla grandezza misurata.
Per risalire dal valore del segnale a quello della concentrazione, che è poi il dato richiesto dall'analisi, si ricorre generalmente al metodo di comparazione nel senso che si confronta il segnale fornito dallo strumento per il campione incognito con il segnale fornito nelle stesse condizioni per un campione di riferimento.
La maggior parte dei metodi analitici strumentali è basato su solide teorie matematiche. Pur tuttavia in qualche caso può accadere di applicare procedimenti strumentali del tutto empirici non supportati da un'adeguata conoscenza teorica; in tal caso l'applicazione puramente analitica è lecita, ma è sempre conveniente e consigliabile accompagnarla con un attento controllo dei dati sperimentali e da uno studio approfondito del sistema sotto misura, al fine di avere precise e chiare informazioni sulle grandezze che vengono misurate e sulle correlazioni fra tali grandezze e la concentrazione.
Ricordato che la titolazione può essere definita come quella operazione analitica che consente di determinare una concentrazione incognita sulla base della esatta misura dell'equivalente quantità di un reattivo di riferimento, possiamo dire che i metodi chimico-fisici di analisi sono correlabili a quelli titrimetrici sotto due aspetti: individuazione del punto finale della titolazione, misura della quantità di reattivo aggiunta fino all'equivalenza.
Generalmente il volume di reattivo viene misurato mediante una buretta. L'unica eccezione è rappresentata dall'analisi coulombometrica in cui il reattivo viene generato elettroliticamente e la sua quantità è determinata mediante misure elettriche. Parecchie delle grandezze fisiche possono essere sfruttate per determinazioni analitiche, con o senza una vera e propria titolazione.
Anche se non di tutte tratteremo in questo manuale, in quanto ci limiteremo a quelle di interesse nell'analisi dell'acqua, riteniamo utile fornire un quadro completo di quelle per le quali gli studi e le ricerche hanno consentito di mettere definitivamente a punto metodi che sulla misura di tali grandezze trovano il loro fondamento e le loro basi:

a) Proprietà estensive:

- massa (o peso);
- volume (di un liquido o di un gas).

b) Proprietà meccaniche:

- peso specifico;
- tensione superficiale;
- viscosità;
- velocità del suono (in un gas).

c) Proprietà correlate all'interazione con l'energia radiante:

- assorbimento di energia radiante (raggi X, ultravioletto, visibile, infrarosso, microonde);
- torbidità;

- emissione di radiazione dietro eccitazione;
- effetto Raman;
- rotazione del piano della luce polarizzata;
- indice di rifrazione;
- dispersione;
- fluorescenza e fosforescenza;
- diffrazione di raggi X e di elettroni;
- risonanza magnetica nucleare ed elettronica.

d) Proprietà elettriche:

- potenziali di semicella;
- curve caratteristiche corrente-voltaggio;
- conducibilità elettrica;
- costante dielettrica;
- suscettibilità magnetica.

e) Proprietà termiche:

- temperature di transizione (punti di fusione, di ebollizione, di trasformazione di fase, ecc.);
- calori di reazioni (combustione, neutralizzazione, ecc.);
- conducibilità termica (di un gas).

f) Proprietà nucleari:

- radioattività.

La situazione teoricamente ideale sarebbe rappresentata dalla disponibilità di tanti metodi chimico-fisici, ciascuno dei quali specifico per un certo elemento, radicale o classe di composti. In realtà, le cose, purtroppo, sono assai diverse e soltanto un numero assai esiguo di metodi analitici è caratterizzato da un elevato grado di specificità. È pertanto necessario quasi sempre fare precedere la determinazione chimico-fisica da una separazione quantitativa, con lo scopo o di isolare il costituente voluto o di rimuovere dal campione nel quale questo è contenuto le eventuali sostanze interferenti. I metodi di separazione più comunemente impiegati sono la precipitazione, la elettrodeposizione, la complessazione, la distillazione, l'estrazione con solvente, la cromatografia di partizione, la cromatografia di adsorbimento, lo scambio ionico, l'elettroforesi, la dialisi.
I criteri di scelta per la proposta di un metodo analitico per l'analisi di un'acqua dovrebbero essere sostanzialmente i seguenti:

– Il metodo deve garantire l'affidabilità della determinazione degli indici considerati con sufficiente precisione ed accuratezza in presenza di normali interferenze.
– Il metodo deve impiegare apparecchiature comunemente disponibili nei laboratori di analisi e controllo dell'inquinamento idrico.
– Il metodo deve essere stato controllato attraverso "ring-test" interlaboratorio per valutarne i limiti di precisione, accuratezza, sensibilità, limite di rivelabilità.
– Il metodo deve essere sufficientemente rapido da consentire analisi routinarie ripetitive.

La proposta di metodo deve essere formulata in modo chiaro, descrivere dettagliatamente tutti i passaggi operativi che il metodo richiede al fine di standardizzare al massimo tutta la procedura. La stessa raccomandazione, in misura ancora più spinta, deve ovviamente valere per il metodo ufficiale elaborato sulla base della proposta e delle osservazioni dei risultati scaturiti dalla sua applicazione da parte di alcuni laboratori pilota.

Le apparecchiature comunemente necessarie in un'analisi di un'acqua sono la bilancia analitica, il pHmetro, il conduttimetro, il turbidimetro, spettrometri di varia natura (UV, IR, visibile, assorbimento atomico), analizzatore del carbonio totale, gascromatografo, sistemi gas-massa, termostato. Essi devono essere mantenuti in efficienza e periodicamente controllati per la bontà del funzionamento e, quindi, per l'affidabilità del risultato fornito.
L'attendibilità del risultato di un metodo analitico può anche dipendere dalla natura dei contenitori impiegati perché in qualche caso questi possono reagire chimicamente con le soluzioni con cui vengono in contatto, con il risultato di alterare la composizione della soluzione e/o rilasciare in soluzione alcune delle specie in essi contenuti. In genere, comunque, il vetro e il polietilene sono i materiali più comunemente impiegati. Per scopi specifici possono essere utilizzati anche contenitori in porcellana, nichel, ferro, alluminio, platino, acciaio inossidabile, materiale plastico di varia natura (teflon, polistirene). Per quanto riguarda il vetro, ne esistono parecchi tipi e gradi, da quello più comune e più economico a quello ultraspecifico caratterizzato da qualità specifiche elevate (come la resistenza meccanica, il basso tenore in boro, la resistenza agli "shock termici", la resistenza agli alcali). Le denominazioni dei vari tipi di vetro e i criteri per la scelta del materiale dei contenitori sono riportati nella Sezione 1010 (Paragrafo 4).

3.1 Metodi fotometrici

Con il termine di analisi fotometrica si intende l'insieme dei metodi di analisi chimica basati sulla misura della intensità luminosa di una radiazione (analisi spettrochimica, colorimetrica, spettrofotometrica, turbidimetrica).
Le regioni spettrali di particolare interesse sono il vicino ultravioletto (3000-4000 A°), il visibile (4000-7500 A°) e la regione dell'infrarosso compresa fra 1 e 25 μm.
L'assorbimento e l'emissione di radiazioni nel campo del visibile e dell'ultravioletto sono associati a fenomeni di transizione a carico degli elettroni più esterni da un'orbita ad un'altra a diverso contenuto energetico, quelli nell'infrarosso a variazioni di energia cinetica di rotazione e di traslazione dei legami delle molecole. Le apparecchiature sperimentali impiegate nell'analisi fotometrica sono costituite da una sorgente luminosa, da un sistema di lenti, da un mezzo disperdente che consente di isolare l'intervallo di lunghezza d'onda desiderato, da un rivelatore.
Per la spettroscopia di emissione nell'ultravioletto e nel visibile le sorgenti luminose generalmente impiegate sono la fiamma, l'arco e la scintilla. Per la spettrofotometria di assorbimento nell'ultravioletto la sorgente più comune è la lampada a scarica in atmosfera di idrogeno, nell'infrarosso i filamenti di Nernst e le bacchette al carburo di silicio (Globar), nel visibile la lampada a filamento di tungsteno incandescente e quelle a vapori di mercurio.
Il materiale con cui sono costruiti sia le lenti che i prismi deve essere scelto in funzione della regione spettrale nella quale si opera. Nell'ultravioletto è generalmente impiegato il quarzo, nell'infrarosso il cloruro di sodio, il bromuro di potassio, il fluoruro di litio o la fluorite, nel visibile più semplicemente il vetro.
Per ciò che riguarda i rivelatori anche se nel visibile si può impiegare direttamente l'occhio umano, tuttavia quelli più impiegati nelle zone del visibile e dell'ultravioletto sono le lastre fotografiche e le cellule fotoelettriche (fotovoltaiche, a fotoemissione, a gas a vuoto, a strato di sbarramento, fotoconduttive). Nel caso si debbano rilevare radiazioni di bassa intensità si può fare uso con profitto di un fotomoltiplicatore, dispositivo estremamente sensibile alla luce e basato sul fenomeno dell'emissione secondaria.
Nell'infrarosso si sfrutta invece il contenuto termico della radiazione; su tale principio sono infatti basati i rivelatori comunemente impiegati in tale campo di lunghezza d'onda, cioè i bolometri, le termopile, i termistori, le celle di Golay.
Vengono descritte nel seguito alcune delle tecniche fotometriche di uso più comune.

3.2 Metodi spettrochimici

Con l'espressione analisi spettrochimica s'intende l'applicazione della spettroscopia di emissione all'analisi chimica, cioè al riconoscimento ed alla determinazione quantitativa delle specie chimiche.

Il metodo spettrochimico per emissione rivela generalmente soltanto la specie chimica degli elementi, non del composto; esaminando cioè un composto, se ne mettono in evidenza soltanto gli elementi chimici che lo costituiscono, come se si trattasse di un miscuglio. L'analisi chimica invece attraverso reazioni particolari caratterizza la molecola del composto o gli ioni in cui essa è dissociata.
La sensibilità di riconoscimento degli elementi è per quasi tutti molto più elevata per via spettroscopica che per via chimica.
In linea generale quindi il metodo spettroscopico è molto superiore al metodo chimico nell'analisi qualitativa per la ricerca di tracce di elementi e nell'analisi quantitativa per la determinazione di piccole quantità di elementi.

3.2.1 Emissione

Effetto termico - Riscaldando una sostanza, solida o liquida, oltre i 500°C questa incomincia ad emettere luce, prima rosso scura, poi man mano che la temperatura aumenta, rosso chiara, arancione, gialla, ed infine bianca a 1300°C circa. Lo spettro è continuo. Con l'aumento della temperatura compaiono uno dopo l'altro nello spettro i sette colori dell'iride nell'ordine dal rosso al violetto. Aumentando ancora la temperatura oltre i 1300°C, varia il rapporto del contenuto energetico delle varie zone, modificandosi a favore delle maggiori frequenze, che corrispondono a livelli energetici superiori cioè a più alte temperature di eccitazione.
Se aumentando ancora la temperatura il solido od il liquido si trasformano in vapore, si ha ancora emissione di luce, ma con spettro discontinuo, cioè a righe. Una variazione nella temperatura del vapore emittente modifica a sua volta i rapporti d'intensità delle righe spettrali.

Urto elettronico - Provocando una scarica elettrica in un tubo a gas rarefatto (tubo di Geissler) si ha emissione di luce senza considerevole innalzamento di temperatura. Lo spettro è generalmente discontinuo e può estendersi, come nel caso dell'effetto termico, dall'infrarosso all'ultravioletto. L'emissione è dovuta all'urto degli elettroni uscenti dal catodo contro gli atomi o le molecole del gas.

Spettri atomici e molecolari - Nei vapori portati ad alta temperatura e nei gas rarefatti la materia si trova sotto forma di atomi liberi: in queste condizioni si ottengono spettri a righe dei singoli elementi chimici. Se le condizioni non sono tali da dissociare tutte le molecole, si ha emissione anche da parte delle molecole, sotto forma di spettri di bande. Ciascun elemento può emettere uno spettro più o meno ricco di righe a seconda della complessità della nube elettronica che contorna il nucleo nel suo atomo. All'emissione partecipano soltanto gli elettroni esterni al nucleo. L'eccitazione consiste nel portare uno o più dei suddetti elettroni su orbite più esterne delle normali, o, in altri termini, nel promuovere l'atomo ad un superiore livello energetico per effetto dell'apporto dell'energia di eccitazione (urto anelastico fra atomi o urto elettronico). Da questo superiore livello energetico, instabile perchè non corrispondente ad una struttura di equilibrio, l'atomo ritorna immediatamente al livello primitivo restituendo la differenza di energia sotto forma di luce di una data frequenza. Per ogni determinato salto elettronico si ha

$$E' - E'' = h\nu$$

dove E'' è l'energia dell'atomo allo stato normale, ν la frequenza della radiazione emessa, h la costante di Planck. La varietà dei salti elettronici da un livello ad un altro è in relazione con la complessità dell'atomo. Emettono più frequenze (e quindi più righe spettrali) anche atomi estremamente semplici, ad esempio con un solo elettrone esterno, come l'idrogeno; ciò è dovuto al fatto che i livelli instabili nei quali ciascun elettrone può essere promosso sono più di uno.

Energia di eccitazione - Ad ogni differente salto elettronico corrisponde un diverso valore dell'energia di eccitazione necessaria a provocarlo.
Il numero di frequenze emesse da un elemento aumenta quindi con l'aumentare dell'energia di eccitazione, ed aumenta quindi la complessità del suo spettro.

Intensità delle righe di un elemento - La diversa intensità delle righe spettrali di un elemento è in relazione con la frequenza relativa dei vari salti. Il salto che si verifica il maggior numero di volte nell'unità di tempo corrisponderà alla riga più intensa. L'aumento dell'energia di eccitazione modifica la ripartizione dei salti, quindi l'intensità relativa delle righe.
Ionizzazione - Se l'energia di eccitazione supera un certo valore limite si ha l'estrazione dalla nube elettronica di uno o più elettroni. La nube stessa acquista quindi la struttura della nube dell'elemento a numero atomico immediatamente inferiore se la perdita è di un solo elettrone, inferiore di due posti se la perdita è di due elettroni, ecc.. In effetti però si raggiunge soltanto una forte somiglianza, non la perfetta identità con lo spettro degli elementi a numero atomico inferiore perché la maggior carica del nucleo tiene più fortemente legati gli elettroni periferici. Allo spettro dell'atomo neutro si sovrappone quindi lo spettro dell'atomo ionizzato dello stesso elemento, e lo spettro dell'elemento si fa più complesso. Lo spettro dell'atomo neutro si dice primo, lo spettro dell'atomo che ha perduto un elettrone si dice spettro secondo e così via, e si indicano con i numeri romani, I, II, III, ecc.. Con l'aumento dell'energia di eccitazione compare dapprima lo spettro I, poi lo spettro II, poi lo spettro III e così via.

Mezzi di eccitazione

Fiamma acetilene-aria - Il semplice becco Bunsen si presta molto male per l'analisi spettrochimica. La fiamma produce infatti eccitazione esclusivamente per effetto termico, e, per la sua temperatura non molto elevata (2000°C circa), è sorgente luminosa a modesta energia di eccitazione; essa tuttavia può anche fornire righe dello spettro II.
Con la fiamma si ottengono spettri di tutti gli elementi tranne i gas nobili, gli alogeni e gli elementi H, O, N, S, Se. La fiamma presenta una sensibilità di riconoscimento assai elevata.
Gli elementi che non danno spettro d'arco mostrano, in generale, righe sensibili soltanto nello spettro dell'atomo ionizzato.

Arco continuo - Si accende in corrente continua di 3-12 ampere a 150-200 V, fra elettrodi della sostanza da esaminare (conduttrice) o fra elettrodi-supporto di carbone con foro per la sostanza in esame. Produce eccitazione per effetto termico e per urto elettronico, con forte prevalenza del primo.

Arco intermittente - Si ottiene in corrente continua od alternata, con dispositivo di interruzione meccanica od elettrica ad alta frequenza (Pfeilsticker); non dà luogo ad arroventamento degli elettrodi, lo spettro è più semplice ed è costituito da righe più intense (righe di più bassa eccitazione), non dà le bande del carbonio e non dà fondo continuo.

Scintilla condensata - Si ottiene con un circuito uguale o simile a quello di Fig. 2.
La scintilla produce eccitazione per effetto termico e per urto elettronico, con forte prevalenza del secondo. E il mezzo di eccitazione più ionizzante. Il potere ionizzante aumenta con l'aumento della capacità, diminuisce con l'aumento dell'induttanza.

Plasma - Il plasma è un particolare stato di aggregazione della materia in cui un sistema altamente ionizzato composto da ioni, elettroni e particelle neutre ad alta energia è caratterizzato dalla sua tendenza alla neutralità elettrica rispetto all'ambiente circostante. Il plasma viene di solito prodotto applicando energia ad un comune gas rarefatto (gas plasmageno, generalmente argon) sino ad ottenere la ionizzazione degli atomi. La ionizzazione può essere ottenuta mediante l'azione di un forte campo elettrico generato direttamente oppure per mezzo di induzione elettrica o magnetica.

3.2.2 Assorbimento molecolare

A differenza dei metodi per emissione, i metodi per assorbimento rivelano la struttura molecolare delle sostanze e possono quindi venire applicati al riconoscimento ed alla determinazione quantitativa dei composti i quali vengono in tal caso esaminati di regola in soluzione, impiegando solventi praticamente privi di un proprio spettro di assorbimento.

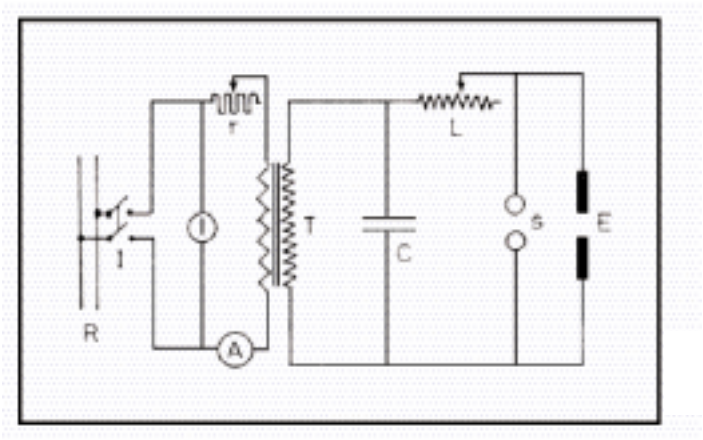


Figura 2: Schema di circuito per scintilla condensata.
R = rete di distribuzione a corrente alternata; l = lampadina spia; r = reostato; C = serie di condensatori elettrostatici; s = scaricatore di sicurezza; I = interruttore; A = amperometro; T = trasformatore elevatore; L = induttanza variabile; E = elettrodi per la scintilla.

I metodi per assorbimento si basano sulla capacità di una soluzione (o di un mezzo trasparente qualsiasi) di assorbire in funzione della frequenza della luce che la attraversa. Misurando il valore dell'assorbimento per le diverse frequenze o lunghezze d'onda si ottiene la curva di assorbimento (Fig. 3) che è caratteristica della sostanza e che può quindi servire al suo riconoscimento, mentre il valore assoluto dell'assorbimento per una data frequenza o lunghezza d'onda può servire per stabilire la concentrazione della sostanza nella soluzione.

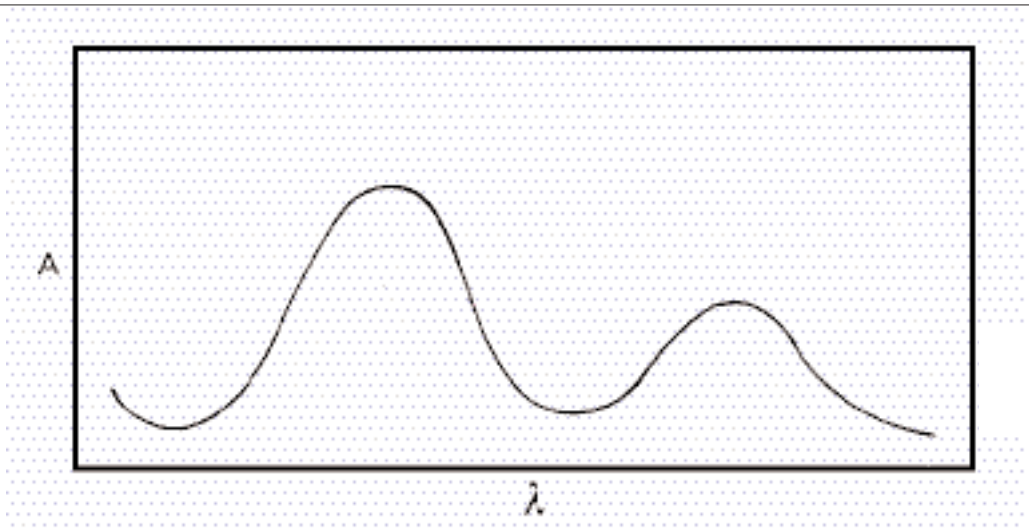


Figura 3: Esempio di spettro di assorbimento.

Lo spettro di assorbimento nel visibile - relativo cioè al colore di una sostanza - è una piccola parte dello spettro elettromagnetico; esso è significativamente diverso da zero quando l'energia di transizione elettronica, che accompagna l'assorbimento, è debole. Il colore osservato è complementare di quello assorbito (Tab. 4).

Tabella 4: Corrispondenza (complementarietà) tra colore osservato e colore assorbito

Colore osservato	Colore assorbito
violetto	giallo-verde
blu	giallo
verde-blu	arancio
verde	porpora
giallo-verde	violetto
giallo	blu
arancio	verde-blu
rosso	blu-verde

L'utilizzazione delle radiazioni assorbite nell'analisi chimica, che chiamasi colorimetria se riguarda lo spettro visibile, è fondata su due leggi che risalgono rispettivamente al 1729 e al 1852 e mettono in relazione l'intensità della radiazione assorbita con lo spessore dello strato e con la concentrazione. La prima, legge di Bouguer, abitualmente nota sotto il nome di Lambert, riguarda le sostanze solide; siano I_i ed I_e rispettivamente le intensità della radiazione incidente sulla sostanza e della stessa radiazione emergente, il rapporto I_e/I_i chiamasi *trasparenza* ed il rapporto reciproco *opacità;* il logaritmo della opacità chiamasi *densità ottica* o *estinzione o assorbanza.* La densità ottica è proporzionale allo spessore dello strato attraversato, cioè:

$$\log \frac{I_i}{I_e} = K \cdot s$$

La costante K, che è uguale a log (I_i/I_e), per s=1 cm, è detta "coefficiente di estinzione" o "estinzione specifica" ed è un dato caratteristico della sostanza per una determinata lunghezza di onda.
L'assorbimento di una soluzione varia con lo spessore (s) e con la concentrazione (c) secondo la:

$$\log \frac{I_i}{I_e} = K \cdot s \cdot c$$

nota come legge Lambert–Beer.

Per s=1 cm e c=1 si ha:

$$\log \frac{I_i}{I_e} = K$$

dove K anche in questo caso è detto "coefficiente di estinzione" o "estinzione specifica" della sostanza disciolta.
Il "coefficiente di estinzione molare" è il valore di K quando s=1 cm e c è uguale ad una grammo-molecola per litro.
La legge di Lambert-Beer è valida finché, con l'aumentare della concentrazione, aumenta proporzionalmente il complesso od il gruppo funzionale a cui è dovuto l'assorbimento della reazione considerata. Quando tale proporzionalità non è più rispettata, la legge non è più valida; riportando in grafico l'assorbanza A in funzione della concentrazione C, per un determinato cammino ottico costante, si verificherà una deviazione negativa (a) o positiva (b), (Fig. 4).
Le cause che determinano deviazioni dalla linearità sono diverse: fenomeni di dissociazione ionica nei quali si ha un equilibrio delle specie adsorbenti che varia con la concentrazione, o fenomeni di decomposizione, nei quali cambia la natura delle specie disciolte. Altri fattori di disturbo sono gli elettroliti e la formazione di complessi con le molecole del solvente. Di qui la necessità di stabilire caso per caso l'intervallo di concentrazione entro cui è valida la legge di Lambert-Beer.

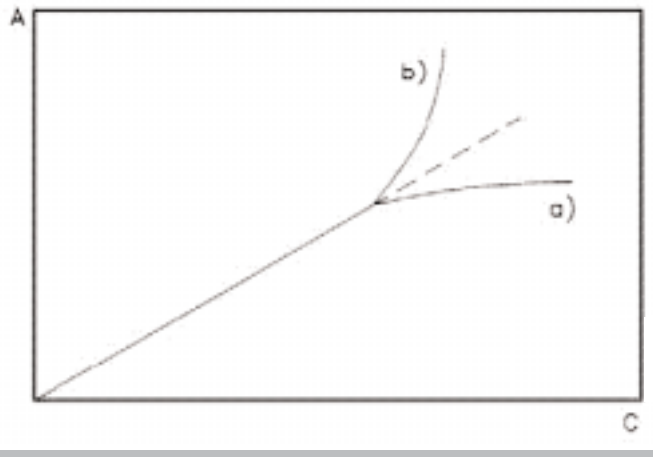


Figura 4: Validità della legge di Lambert-Beer.

L'analisi qualitativa mediante spettrofotometria di assorbimento si basa come si è detto sul confronto fra la curva di assorbimento della sostanza in esame e le curve di assorbimento di composti noti. In particolare devono coincidere le posizioni dei massimi e dei minimi e deve essere uguale il rapporto fra i valori dell'assorbimento in corrispondenza del massimo e in corrispondenza del minimo. Affinché tali curve siano confrontabili è necessario adoperare sempre lo stesso solvente; questo infatti influisce sia sulla posizione che sulla intensità della banda di assorbimento. La presenza di sostanze interferenti che modificano la curva di assorbimento complica l'analisi qualitativa.
L'analisi quantitativa è diretta applicazione della legge Lambert-Beer ed è fondata sulla misura dell'assorbimento ad una lunghezza d'onda e sulla conoscenza del coefficiente di estinzione della sostanza disciolta a quella lunghezza d'onda. Per interpolazione si calcola la concentrazione (x) di sostanza disciolta:

$$E_{1\,cm}^{1\%} : E_{1\,cm}^{x\%} = 1 : x$$

Prima di eseguire l'interpolazione è però necessario assicurarsi sperimentalmente che sia valida la legge di Lambert-Beer determinando il valore di $E_{1\,cm}$ di soluzioni a concentrazioni note e comprese in un intervallo in cui cade presumibilmente la concentrazione incognita.
La misura dell'assorbimento si effettua generalmente alla lunghezza d'onda ove si ha il massimo di assorbimento, operando quindi in condizioni di massima sensibilità. Talvolta, per evitare interferenze da parte di altre sostanze assorbenti può essere necessario operare ad una lunghezza d'onda diversa da quella corrispondente al massimo di assorbimento. In tal caso si dovrà scegliere la regione dello spettro in cui la variazione dell'assorbanza in funzione della lunghezza d'onda non sia molto grande.
Gli strumenti impiegati in questo tipo di analisi sono gli spettrofotometri che consentono la determinazione dell'assorbimento della luce da parte di una soluzione. Lo schema di tali apparecchi è riportato nella Sezione 1010 (Fig. 1).

3.2.3 Turbidimetria e nefelometria

La legge di Lambert-Beer che sta alla base di tutta la colorimetria, è una legge limite, ossia una legge valida soltanto quando sono rispettate alcune condizioni sperimentali ben precise. Una di queste condizioni stabilisce che la soluzione in esame sia perfettamente limpida, esente cioè da torbidità, libera da colloidi o da particelle cristalline in sospensione.
Quando la soluzione non soddisfa tali esigenze la legge di Lambert-Beer non è più valida e di conseguenza, per quanto detto sopra, il metodo colorimetrico non può essere usato perché darebbe risultati assolutamente falsi: infatti in tali condizioni, oltre ad un fenomeno di assorbimento, la luce subisce anche un fenomeno di diffusione da parte delle particelle in sospen-

sione. La determinazione quantitativa può essere allora eseguita effettuando una misura turbidimetrica o una misura nefelometrica.
I metodi turbidimetrici e nefelometrici di analisi quantitativa si basano sul seguente principio: trattando una soluzione contenente una sostanza da determinare con un particolare reattivo precipitante si ha un intorbidimento che è tanto maggiore quanto più elevata è la concentrazione della sostanza in esame. Quando un fascio di luce va a colpire la sospensione o soluzione colloidale in esame, la luce viene in parte trasmessa e in parte diffusa in tutte le direzioni. Se l'intensità della radiazione diffusa é molto piccola, la quantità di sostanza viene determinata facendo uso degli apparecchi usati per le determinazioni colorimetriche. L'intensità della radiazione trasmessa dipenderà ovviamente dalla concentrazione del colloide oppure dalla quantità di precipitato in sospensione.
Quando l'intensità della radiazione diffusa è molto elevata, cioè quando l'intensità della luce riflessa dalle particelle in sospensione è maggiore dell'intensità della luce trasmessa dalla soluzione stessa, si deve misurare la prima per evitare errori grossolani. La misura in questo caso viene eseguita a 90° rispetto alla luce incidente. Gli apparecchi usati sono particolari colorimetri, disposti in modo tale da misurare l'intensità delle radiazioni diffuse anziché di quelle trasmesse.
Per compiere analisi turbidimetriche e nefelometriche si deve tener conto di diversi fattori:

a) la dimensione dei granuli precipitati e la velocità di precipitazione, parametri che influiscono direttamente sulle proprietà assorbenti e riflettenti delle particelle, dipendono dalla concentrazione degli ioni precipitanti, di conseguenza la concentrazione di questi ultimi deve rimanere costante;
b) si devono standardizzare al massimo le condizioni sperimentali e cioè modalità di mescolamento e temperatura della soluzione;
c) a volte si rende necessaria la presenza in soluzione di colloidi protettori che influiscono sulla finezza e stabilità del precipitato: nel caso si ricorra all'uso di queste sostanze è chiaro come debbano essere costanti la loro natura chimica e la loro concentrazione;
d) poiché per tale genere di analisi si ricorre a reazioni di precipitazione e queste non sono istantanee, ma obbediscono a una certa cinetica, occorre conoscere il tempo che intercorre tra mescolamento e massimo della torbidità e tenere costante questo intervallo per ogni determinazione.

Come abbiamo visto la torbidità è funzione della concentrazione e della distribuzione delle particelle; è funzione anche del percorso compiuto dalla luce nel campione. Di conseguenza, poiché è molto difficile ogni volta riprodurre esattamente tutte le condizioni operative (cioè preparare una sospensione stabile e uguale di precipitato), questo metodo non è molto preciso. In genere si ottiene una precisione del ±5-10%: in casi particolari però è possibile ottenere risultati migliori. Il campo di applicazione di queste tecniche è in compenso veramente vasto poiché può essere esteso a tutti i casi in cui si ha formazione di precipitati e di soluzioni colloidali.

3.2.4 Fluorimetria

La fluorimetria si basa sulla proprietà del campione, se esposto a una radiazione di una determinata lunghezza d'onda, di assorbire energia e di riemetterla sotto forma di una radiazione di lunghezza d'onda uguale o più lunga di quella incidente. Se tale riemissione avviene in un periodo di circa 10^{-9} secondi il fenomeno si chiama fluorescenza, se invece viene dopo circa 10^{-6} secondi allora si parla di fosforescenza.
Questa tecnica utilizza quindi la luce che viene emessa dalla sostanza in esame per determinare la sua concentrazione. L'analisi deve essere eseguita in soluzioni molto diluite.
L'apparecchio usato è costituito, a grandi linee, da una lampada a raggi ultravioletti (a vapori di mercurio o di xenon) che irradia la soluzione. L'osservazione avviene in direzione perpendicolare ai raggi incidenti e la misura dell'intensità dei raggi emergenti viene fatta mediante fotocellule. Durante l'analisi si devono tenere costanti la lunghezza d'onda della luce incidente, il pH e la temperatura delle soluzioni.

Per risalire alla concentrazione della soluzione in esame si applica la seguente relazione:

$$I_f = I_o B (1 - 10^{-kl})$$

dove:
I_f = intensità radiazione fluorescente;
I_o = intensità radiazione incidente;
B = percentuale radiazione incidente che viene assorbita;
k = coefficiente di estinzione;
l = spessore della soluzione attraversata;
c = concentrazione della soluzione.

Per ottenere risultati il più possibile affidabili conviene operare con il metodo della curva di taratura riportando le intensità della radiazione di fluorescenza in funzione della concentrazione della sostanza emettente.

3.2.5 Assorbimento atomico

La spettrofotometria di assorbimento atomico consiste nella misura della concentrazione di un elemento sulla base della capacità di questo di assorbire, allo stato atomico, luce di frequenza caratteristica. Valgono le leggi della spettrofotometria di assorbimento: l'assorbimento è cioé proporzionale alla concentrazione dell'elemento nel campione da analizzare.
La tecnica dell'assorbimento atomico sembra assai simile a quella della fotometria di emissione alla fiamma, in realtà i due metodi sono sostanzialmente diversi.
Nella spettrofotometria di emissione alla fiamma, la soluzione viene inviata sotto forma di minuscole goccioline all'interno di una fiamma; gli elementi presenti nella soluzione vengono quindi trasformati dallo stato molecolare a quello atomico. Una piccola frazione di questi atomi può assorbire energia dalla fiamma eccitandosi dallo stato fondamentale ad uno stato caratterizzato da un maggiore contenuto energetico. Nel ritorno allo stato fondamentale si ha emissione di radiazioni caratteristiche con intensità proporzionale alla concentrazione dell'elemento nella fiamma. Questo procedimento può essere impiegato per la determinazione di metalli facilmente eccitabili, come gli alcalini, ma risulta di scarsa efficacia per la determinazione di elementi meno facilmente eccitabili. Inoltre oscillazioni nella temperatura della fiamma e la presenza di interferenze di fondo sono causa della scarsa riproducibilità dei risultati.
Atomi presenti allo stato fondamentale sono in grado di assorbire radiazioni di lunghezza d'onda specifica dell'elemento in questione (radiazioni di risonanza). Questo è l'assorbimento atomico che, al contrario della spettrofotometria di fiamma, viene applicato con successo nella determinazione di oltre sessanta elementi.
Le interferenze spettrali e di fiamma possono essere eliminate, quelle chimiche rimosse con un opportuno pretrattamento del campione da analizzare. I vantaggi principali della tecnica dell'assorbimento atomico sono l'elevata sensibilità (dovuta alla grande concentrazione degli atomi assorbenti allo stato fondamentale), l'accuratezza (dal momento che l'effetto di transizioni atomiche casuali e di variazione della temperatura della fiamma è di entità trascurabile), la versatilità (poiché la determinazione non è condizionata dalla necessità di eccitare gli atomi dallo stato elementare), l'alto grado di specificità, la semplicità e la rapidità di operazione.
Lo schema di un apparecchio per assorbimento atomico è riportato nella Sezione 1010 (Fig. 2).

3.2.6 Spettrometria di emissione in sorgente al plasma

La spettrometria di emissione atomica in sorgente al plasma (ICP-AES) si sta sempre più diffondendo nei laboratori di controllo ambientale, andando ad affiancare le tradizionali tecniche di spettrofotometria di assorbimento atomico, in quanto presenta alcuni notevoli vantaggi:

- capacità di analisi multielementare;

- estesi intervalli di linearità;
- ottime sensibilità nell'analisi di alcuni elementi (Be, Sr, Ti, Zr);
- scarso peso delle interferenze di tipo chimico.

Sono invece possibili interferenze di tipo fisico e, in particolare, di tipo spettrale dato che l'elevata temperatura che si raggiunge nella torcia a plasma rende possibile un maggior numero di salti quantici.
Il plasma è un particolare stato di aggregazione della materia in cui un sistema altamente ionizzato composto da ioni, elettroni e particelle neutre ad alta energia è caratterizzato dalla sua tendenza alla neutralità elettrica rispetto all'ambiente circostante. Il plasma viene di solito prodotto applicando energia ad un comune gas rarefatto (gas plasmageno, generalmente argon) sino ad ottenere la ionizzazione degli atomi. La ionizzazione può essere ottenuta mediante l'azione di un forte campo elettrico generato direttamente oppure per mezzo di induzione elettrica o magnetica.

Sorgenti di plasma

Sono stati studiati diversi tipi di sorgente di plasma ed alcune di queste sono state prese in considerazione come possibili sorgenti di eccitazione per la spettrometria atomica di emissione (AES) e precisamente:

- plasma generato da corrente continua (DCP);
- plasma accoppiato capacitativamente con microonde (CMP);
- plasma accoppiato induttivamente con radiofrequenza (ICP);
- plasma indotto a microonde (MIP).

Negli spettrometri per uso analitico viene utilizzata principalmente la sorgente ICP mentre altre sorgenti vengono usate per applicazioni particolari quali ad esempio la rivelazione in gas cromatografia (sorgente MIP). Nei sistemi ICP, il campo magnetico variabile viene ottenuto applicando una corrente ad elevata frequenza ad una bobina di induzione entro la quale fluisce il gas ionizzato. Il campo elettrico viene generato dalla oscillazione periodica del flusso di induzione magnetica ed è diretto lungo linee di forza circolari giacenti in un piano perpendicolare alla direzione di flusso del campo magnetico. Come gas plasmageno viene utilizzato generalmente argon. Il gas ionizzato fluisce attraverso un tubo di quarzo, o di altro materiale refrattario trasparente ad un ampio spettro di radiazioni emesse, la cui estremità superiore è inserita nella bobina connessa al generatore ad alta frequenza. Il processo di ionizzazione viene innescato disperdendo nel gas di sostentamento degli elettroni liberi prodotti per effetto termoelettrico da una piccola asta di grafite inserita nel campo elettrico o mediante una scarica Tesla. Gli elettroni e gli ioni formati vengono quindi accelerati dal campo magnetico indotto con conseguente riscaldamento per effetto Joule dovuto alla resistenza del gas di supporto. Una volta innescata, la sorgente plasma si autosostiene assumendo la forma di una fiamma luminosa emergente dalla parte superiore della bobina. La temperatura del plasma si mantiene mediamente sui 6000°K e, localmente, può raggiungere anche i 10.000°K. La regione utile per scopi analitici è però la "coda" tra i 5000 e i 6000°K; in questa zona è immessa la soluzione del campione da analizzare nebulizzata in argon.
Lo spettrometro ICP-AES risulta costituito dalle seguenti parti principali:

- sistema di atomizzazione ed eccitazione;
- sistema dispersivo (monocromatore o policromatore);
- rivelatore (fotomoltiplicatore);
- sistema di controllo, acquisizione ed elaborazione dei dati.

Sistema di atomizzazione ed eccitazione

Il sistema di atomizzazione ed eccitazione ICP è costituito principalmente da un generatore di radiofrequenza, un circuito adattatore d'impedenza, una bobina e torcia, una unità di intro-

duzione e trasporto del campione alla torcia stessa. Il generatore di radiofrequenza fornisce la corrente ad alta frequenza alla bobina e comprende un oscillatore a frequenza libera o fissa. Nei generatori a frequenza libera la frequenza di oscillazione varia in funzione dell'impedenza del plasma, mentre in quelli a frequenza fissa controllata a quarzo, la frequenza è mantenuta costante da un cristallo piezoelettrico. Tutti i generatori a radiofrequenza vengono schermati a norma di legge e periodicamente controllati. Il campo delle frequenze utilizzabili è compreso tra 1,6 e 60 MHz. La maggior parte degli spettrometri commerciali a frequenza stabilizzata opera sulla frequenza di 27,12 o di 40,7 MHz anche per ottemperare alle norme di legge. La potenza in uscita può variare da 0,5 a 7 kW, anche se per la maggior parte degli spettrometri commerciali è compresa tra 1-2 kW. Con i solventi organici è necessario adottare valori di potenza più elevati rispetto a quelli delle soluzioni acquose mentre l'uso di gas poliatomici (es. azoto), quale gas di supporto richiede potenze superiori rispetto a quelle richieste dai gas nobili. Esistono diversi tipi di torce che si differenziano tra di loro per forma, dimensioni e numero di camere coassiali. In genere, la torcia è costituita da uno o più tubi concentrici (di solito tre) in materiale refrattario non conduttore (quarzo o allumina). Il gas plasmageno fluisce nel condotto più esterno con portate che dipendono dalle dimensioni della torcia. Il gas entra nel condotto tangenzialmente; in tal modo assume una traiettoria a spirale entro la quale transita longitudinalmente il gas di trasporto del campione. Il gas che fluisce nel condotto più esterno è anche chiamato gas di raffreddamento del plasma, mentre il gas più interno viene chiamato gas di trasporto. L'unità di trasporto del campione alla torcia è generalmente costituita, nel caso di campioni liquidi, da un nebulizzatore per la formazione dell'aerosol e da una camera (analoga alla camera di premiscelazione degli atomizzatori in fiamma impiegati nella spettrometria di assorbimento atomico) che trattiene le goccioline di maggiori dimensioni prima che l'aerosol entri nella torcia. Il nebulizzatore può essere di tipo pneumatico (con flussi concentrici o tangenziali), microconcentrico, ad ultrasuoni o di tipo Babington. Quest'ultimo viene usato per le soluzioni viscose ad elevato contenuto di sali e per le sospensioni. Tali nebulizzatori sono molto simili a quelli utilizzati per la spettroscopia di assorbimento (AAS) ma differiscono da questi per quanto riguarda la portata del gas. Infatti mentre nel caso della spettroscopia AAS, la portata è di circa 10 $L \cdot min^{-1}$ per l'ICP è mantenuta a circa 1 $L \cdot min^{-1}$. Di conseguenza il sistema di nebulizzazione dell'ICP richiede, rispetto al sistema AAS, tempi più lunghi per la stabilizzazione, possiede una minore efficienza ed è più soggetto a problemi di intasamento. La soluzione da analizzare viene introdotta nel nebulizzatore mediante una pompa peristaltica. Per la determinazione di elementi volatili o che liberano idruri volatili (As, Sb, Se e Te), si può utilizzare, analogamente a quanto avviene per la spettrometria di assorbimento atomico, una speciale unità per la formazione ed il trasferimento dell'idruro.

Sistema ottico dispersivo

Tale sistema consente il trasferimento, la dispersione e la selezione delle radiazioni elettromagnetiche emesse ed in genere comprende:

1) un sistema di lenti e/o specchi;
2) un monocromatore.

Tra la torcia ed il monocromatore viene generalmente posta una lente biconvessa la quale ha la funzione di focalizzare l'immagine sulla fenditura d'ingresso del monocromatore. Quest'ultimo, che costituisce il cuore del sistema di dispersione delle radiazioni emesse, è costituito da: una fenditura di ingresso delle radiazioni emesse, un collimatore, un elemento disperdente ed una fenditura di uscita che permette di selezionare le bande spettrali analitiche della radiazione elettromagnetica emessa. Il sistema disperdente può anche essere costituito da un policromatore capace di selezionare più di una banda spettrale alla volta per mezzo di fenditure fisse opportunamente posizionate, in rapporto alla geometria dell'insieme, in modo da intercettare e selezionare le lunghezze d'onda d'interesse. La larghezza e l'altezza della fenditura possono essere variate con continuità o per passi discreti, in modo da stabilire la larghezza della banda passante ed il fattore spettrale di trasmissione. Il collimatore produce

un fascio parallelo di radiazioni uscenti dalla fenditura d'ingresso. Con il monocromatore è possibile selezionare una banda di lunghezze d'onda alla volta e, pertanto, l'esame dell'intero spettro viene effettuato variando l'angolo dell'elemento disperdente rispetto alla radiazione incidente; ciò è realizzato con un controllo motorizzato a passi oppure continuo (spettrometro sequenziale). Con il policromatore è possibile esaminare più bande spettrali alla volta e quindi analizzare più elementi contemporaneamente (spettrometro simultaneo). Molti spettrometri sono muniti di entrambi i sistemi. Quando si opera nella banda spettrale al di sotto della lunghezza d'onda a cui interferisce l'ossigeno atmosferico (circa 190 nm), occorre collocare il sistema ottico sotto vuoto o in flusso di gas inerte (es. azoto). Generalmente sono sufficienti 30 minuti per creare le condizioni di vuoto, necessarie all'effettuazione dell'analisi. Indipendentemente dal tipo di spettrometro utilizzato, simultaneo o sequenziale, il sistema ottico deve sempre essere caratterizzato da un elevato potere risolvente (0,01-0,02 nm) e da una ridotta luce diffusa.

Rivelatore delle radiazioni

Come rilevatore viene solitamente impiegato un fotomoltiplicatore che converte le intensità delle radiazioni elettromagnetiche emesse in segnale elettrico. Esso è costituito da una cellula fotoelettrica e da un sistema di amplificazione racchiusi in un tubo di vetro in cui si è praticato un vuoto molto spinto. La regione spettrale di lavoro del fotomoltiplicatore è determinata dallo strato fotosensibile applicato sul catodo e dal materiale costitutivo della finestra della fotocellula. I principali parametri di qualità del fotomoltiplicatore sono la sensibilità e la corrente di buio. La sensibilità globale di un fotomoltiplicatore dipende da fattori quali il materiale di cui è composto il catodo, la geometria, il numero di salti (dinodi), la tensione applicata e la frequenza (energia) dei fotoni incidenti. In genere la sensibilità è molto elevata e tipicamente può raggiungere i 100-200 ampere/lumen. Per corrente di buio si intende la corrente che fluisce verso l'anodo in assenza di illuminazione del catodo. Questa è dovuta principalmente all'emissione termoionica di elettroni e quindi dipende dalla temperatura e dal potenziale di estrazione di elettroni dal fotocatodo. Nei moderni spettrometri di tipo simultaneo vengono utilizzati rivelatori allo stato solido, che stanno rapidamente sostituendo i vecchi fotomoltiplicatori. Questi rivelatori sono formati da numero notevole di "chip" fotosensibili di silicio in grado ciascuno di coprire una zona spettrale dell'ampiezza di circa 0,4 nm.

Sistema di acquisizione ed elaborazione dati

Il sistema di acquisizione ed elaborazione dati è in genere costituito da un'unità gestita da elaboratore il quale controlla anche i parametri dello spettrometro e in certe configurazioni anche quelli della torcia, del generatore e dell'unità di introduzione. Il sistema provvede all'acquisizione ed elaborazione dei valori misurati dal rivelatore e alla memorizzazione di tutti i dati e delle variabili operative.

3.3 Metodi elettrochimici

3.3.1 Potenziometria

La potenziometria può essere definita come il metodo di misura della forza elettromotrice fra due elettrodi di una cella galvanica. Per convenzione nella scala dei potenziali si assume uguale a zero il potenziale dell'elettrodo normale ad idrogeno che consiste di una soluzione ad attività idrogenionica unitaria, nella quale è immersa una laminetta di platino ricoperta di nero di platino, cioè di metallo allo stato finemente suddiviso, caratterizzato pertanto da un'elevata attività superficiale, su cui gorgoglia idrogeno gassoso alla pressione di 1 atmosfera. Il potenziale di un elettrodo è perciò numericamente uguale alla differenza di potenziale misurata ai capi della cella galvanica di analisi, soltanto nel caso in cui l'altro elettrodo, elettricamente connesso al primo con una opportuna giunzione, sia quello normale ad idrogeno.
Al fine di evitare variazioni della forza elettromotrice (f.e.m.) della cella è necessario effet-

tuare la misura senza che vi sia erogazione sensibile di corrente. La misura della f.e.m. viene quindi effettuata con il metodo in opposizione, cioè contrastando l'erogazione suddetta con un sistema costituito da una batteria e da un partitore di tensione.
Gli strumenti impiegati per tale tipo di misura sono i potenziometri ed i pHmetri, che operano con impedenze di ingresso di parecchie centinaia di megaohm, per cui consentono erogazioni di corrente del tutto trascurabili da parte della cella di misura.
Le tecniche potenziometriche di interesse generale sono fondamentalmente di due tipi:

1) misura di f.e.m. di cella;
2) titolazioni potenziometriche.

Le misure di f.e.m. di cella vengono eseguite al fine di studiare le grandezze termodinamiche delle reazioni chimiche (la variazione di energia libera di una reazione di carica o di scarica di una pila è direttamente proporzionale alla f.e.m. di questa) e per determinare le attività ioniche; infatti, il potenziale di un elettrodo varia linearmente con il logaritmo dell'attività delle specie ioniche interessate alla reazione elettrodica, per cui dalla sua misura si può ricavare il valore dell'attività (e quindi in prima approssimazione della concentrazione) degli ioni rispetto ai quali l'elettrodo stesso è sensibile. Se due elettrodi dello stesso tipo, immersi in soluzioni ad attività diverse $a_1>a_2$, sono combinati a formare una cella, la forza elettromotrice di questa è data dall'espressione

$$E = \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_1}{a_2}$$

Una cella di questo tipo viene detta pila a concentrazione e può essere impiegata per determinare l'attività relativa di uno ione in due soluzioni.
L'esempio più importante di questo tipo di misura è la determinazione del pH di una soluzione che, in effetti, è un'operazione di confronto del pH di una soluzione tampone di riferimento con quello della soluzione in esame. Il potenziale di un elettrodo per la misura del pH varia linearmente con il logaritmo dell'attività degli idrogenioni

$$E = E_0 + \frac{RT}{F} \ln a_{H+}$$

ovverossia, per T=25°C e tenuto conto della definizione di pH (= - log a_{H+}) e del passaggio dai logaritmi naturali a quelli decimali:

$$E = E_0 - 0{,}059pH$$

In pratica la misura del pH si effettua con vari tipi di elettrodo, per tutti però valendo una relazione del tipo di quella scritta fra il potenziale ed il pH.
Gli elettrodi più comunemente impiegati in laboratorio sono quello a vetro, quello a idrogeno, quello a chinidrone e quello ad antimonio/ossido di antimonio. L'elettrodo a vetro, a causa del valore assai elevato della sua resistenza elettrica, richiede l'impiego di un potenziometro (pHmetro). Tale elettrodo presenta rispetto agli altri, il vantaggio di non risentire della presenza nella soluzione da analizzare di sostanze ossidanti o riducenti e di fornire risultati precisi su un vasto campo di pH, dimostrandosi inefficiente soltanto in soluzioni molto acide o molte alcaline.
Le titolazioni potenziometriche sono titolazioni nelle quali la forza elettromotrice di una cella o il potenziale di un elettrodo vengono misurati man mano che alla soluzione da titolare viene aggiunta la soluzione del titolante. Generalmente uno degli elettrodi della cella è un elettrodo di riferimento, ad esempio un elettrodo a calomelano, collegato per mezzo di un ponte salino alla cella di titolazione che contiene la soluzione da analizzare nella quale è immerso l'elettrodo indicatore. Il potenziale di quest'ultimo varia secondo un'equazione del tipo

$$E = E_0 + \frac{RT}{nF} \ln a$$

in funzione dell'attività a (concentrazione) dello ione che deve essere quantitativamente determinato nella titolazione.
Gli elettrodi indicatori si distinguono fondamentalmente in quattro tipi:

1) Elettrodi indicatori di cationi cioé degli ioni metallici corrispondenti al metallo di cui è costituito l'elettrodo stesso. Ad esempio nel caso di una laminetta di Ag in soluzione di ioni Ag^+ il potenziale dell'argento dipende dall'attività (concentrazione) degli ioni Ag^+ secondo l'equazione di Nernst:

$$E = E_0 + 0{,}059 \log a_{Ag^+}$$

2) Elettrodi indicatori di anioni capaci di formare col catione del metallo elettrodico un sale assai poco solubile. Nel caso di un elettrodo di argento immerso in una soluzione contenente ioni Ag^+ e Cl^- si ha

$$E = E_0 + 0{,}059 \log a_{Ag^+}$$

ma essendo $K_{ps} = a_{Ag+} \cdot a_{Cl-}$ si ha

$$E = E_0 + 0{,}059 \log\left(\frac{K_{ps}}{a_{Cl^-}}\right) = E_0' - 0{,}059 \log a_{Cl^-}$$

3) Elettrodi indifferenti indicatori di sistemi redox, il cui potenziale risente delle attività (concentrazioni) delle specie presenti in soluzione in quanto varia al variare di esse, secondo un'equazione logaritmica del tipo di quella di Nernst. Ad esempio, un elettrodo di Pt immerso in una soluzione contenente ioni Fe^{3+} e Fe^{2+} assume il potenziale

$$E = E_0 + 0{,}059 \log \frac{a_{Fe^{3+}}}{a_{Fe^{2+}}}$$

ed ogni variazione dell'attività (concentrazione) di Fe^{3+} e Fe^{2+} provoca una variazione del potenziale E dell'elettrodo.

4) Elettrodi a membrana: sono caratterizzati dal fatto di essere costituiti da una membrana permeabile ad alcune specie ioniche. Questa permeabilità provoca sulle due facce della membrana la formazione di una certa differenza di potenziale che è funzione della concentrazione della specie a cui la membrana è permeabile. Il caso più semplice degli elettrodi a membrana è quello dell'elettrodo a vetro costituito da una membrana di vetro speciale permeabile solo agli ioni idrogeno.

Sono attualmente disponibili sul mercato diversi tipi fondamentali di elettrodi a membrana. Il primo funziona per mezzo di una membrana costituita da uno scambiatore liquido di ioni, il secondo è caratterizzato da una membrana solida omogenea costituita in genere da uno strato di sale d'argento insolubile, nel terzo la membrana solida eterogenea è sostituita da gomma al silicone o polietilene impregnata di un sale insolubile; nel quarto, detto a diffusione gassosa, una membrana di opportuna porosità separa la soluzione in esame, nella quale si fa sviluppare il gas (generalmente mediante acidificazione), da una di riferimento il cui pH varia per effetto del gas che, passando attraverso la membrana, diffonde in essa. I più selettivi sono indicati in Tab. 5.

Tabella 5: Caratteristiche degli elettrodi a membrana più selettivi

Tipo di membrana	Denominazione elettrodo	Ione determinabile	p-ione	pH	Interferenze
vetro	pH	H^+	0-14	0-14	Na^+
vetro	sodio	Na^+	0-6	7-10	Ag^+, K^+
vetro	argento	Ag^+	0-7	4-8	Na^+, K^+
vetro	cationi monovalenti	Ag^+, K^+, NH_4^+, Na^+, Li^+	0-6	4-10	
porosa	calcio	Ca^{2+}	0-5	7-11	Ba^{2+}, Sr^{2+}, Ni^{2+}, Mg^{2+}, Na^+
AgCl	cloruro	Cl^-	0-4	0-14	S^{2-}, I^-, CN^-
AgBr	bromuro	Br^-	0-5	0-14	Cl^-, OH^-
AgI	ioduro	I^-	0-7	0-14	S^{2-}, CN^-, Br^-, Cl^-
Ag_2S	solfuro	S^{2-}	0-20	0-14	nessuna
cristallo	fluoruro	F^-	0-6	0-8	nessuna
porosa	cationi bivalenti	Pb^{2+}, Ni^{2+}, Fe^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Ba^{2+}, Sr^{2+}	1-5	5-11	
porosa	rame	Cu^{2+}	1-5	4-12	K^+, Na^+
porosa	perclorato	ClO_4^-	1-4	....	I^-, Br^-, NO_3^-, SO_4^{2-}, Cl^-
silicone	ioduro	I^-	1-7	....	OAc^-, F^-, HCO_3^-
silicone	solfato	SO_4^{2-}	1-5	....	S^{2-},Cl^-, SO_3^{2-}, PO_4^{3-}
silicone	fosfato	PO_4^{3-}	1-5	....	Cl^-, SO_4^{2-}, Co^{2+}, S^{2-}, Br^-, I^-
silicone	nickel	Ni^{2+}	1-5	....	S^{2-}, Br^-, I^-
silicone	cloruro	Cl^-	1-5	....	S^{2-}, I^-
silicone	bromuro	Br^-	1-6		
polietilene	cloruro	Cl^-	soluz. satura-5	0-14	S^{2-}, Br^-, I^-, CN^-
polietilene	bromuro	Br^-	soluz. satura-6	0-14	I^-, CN^-, S^{2-}
polietilene	ioduro	I^-	soluz. satura-7	0-14	S^{2-}
polietilene	solfuro	S^{2-}			
polietilene	cianuro	CN^-	2-5	0-14	S^{2-}, Br^-, I^-
polietilene	ioni rameici	Cu^{2+}	0-8	0-14	Ag^+, Mg^{2+}, Fe^{3+}, Cu^+,Sb^{3+}, Cr^{3+}

Mentre gli elettrodi in commercio più comuni di quest'ultimo tipo sono quelli per la determinazione di ammoniaca, di ossido di carbonio e ossido di azoto, dei primi tre tipi schematizzati in Fig. 8 sono reperibili numerosi esempi.

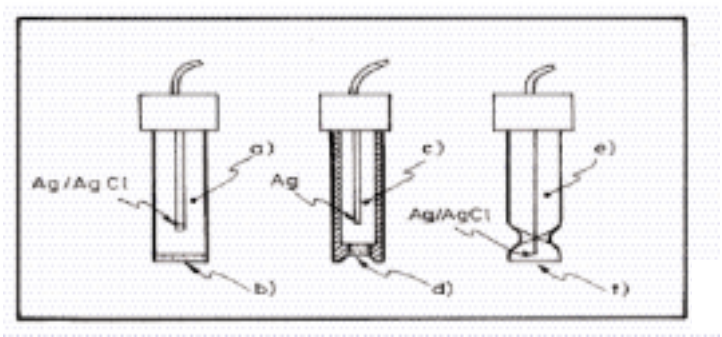


Figura 8: Schemi di elettrodi indicatori. a = scambiatore liquido; b = membrana di vetro poroso; c = soluzione $AgNO_3$; d = membrana a cristalli in alogenuro; e = soluzione di alogenuro; f = membrana di gomma al silicone impregnata con alogenuro.

Per avere a disposizione metodi sempre più rapidi e selettivi, o comunque alternativi, in varie sedi di ricerca e di controllo, recentemente è stata presa in considerazione l'ipotesi di adotta-

re, per la determinazione di alcuni indici, metodi basati sull'impiego di elettrodi iono-selettivi a membrana.
Tale ipotesi ha spesso trovato difficoltà applicative sulla base della scarsa conoscenza delle caratteristiche di impiego e di funzionamento di alcuni di questi elettrodi. In tal senso anche le pubblicazioni scientifiche disponibili e lo stesso manuale fornito dalla ditta costruttrice in qualche caso non sono sufficienti e comunque tali da non consentire una conoscenza tanto approfondita dello strumento a disposizione da poterne valorizzare le potenzialità, in relazione alla praticità, semplicità, rapidità di impiego, tenendone allo stesso tempo nel giusto conto i limiti.
Con tale premessa si comprende come la proposta di un metodo ufficiale potenziometrico con elettrodo a membrana richieda una definizione dettagliata delle operazioni di condizionamento, impiego e conservazione dell'elettrodo nonché delle prove di attendibilità della sua risposta che sole possono fare superare le difficoltà applicative suddette.

Tecniche di misura

La variazione del potenziale dell'elettrodo indicatore, e quindi della f.e.m. della cella, lontano dal punto di equivalenza è minima, poiché l'aggiunta di una certa quantità di reattivo titolante non produce variazioni apprezzabili di concentrazione. In vicinanza del punto di equivalenza le concentrazioni sono esigue.
L'aggiunta di piccoli volumi percentuali di reattivo titolante produce forti variazioni percentuali di concentrazione e quindi del potenziale, per cui al punto finale il salto della f.e.m. o del potenziale diventa brusco (Fig. 9).

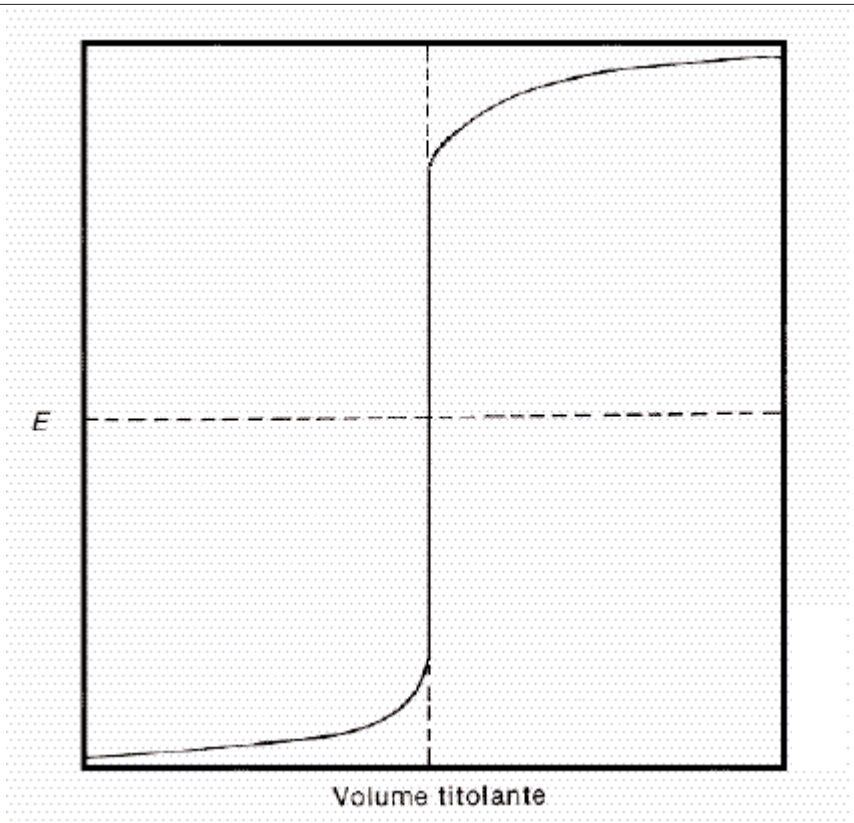


Figura 9: Curva di titolazione potenziometrica.

Teoricamente tale punto coincide con il punto di flesso della curva nel caso di curve di titolazione simmetriche, rilevate con elettrodi indicatori reversibili e con rapporto stechiometrico di reazione fra titolato e titolante pari ad 1. Se queste due condizioni non sono soddisfatte la curva di titolazione è asimmetrica, per cui esiste una piccola differenza fra punto finale e punto

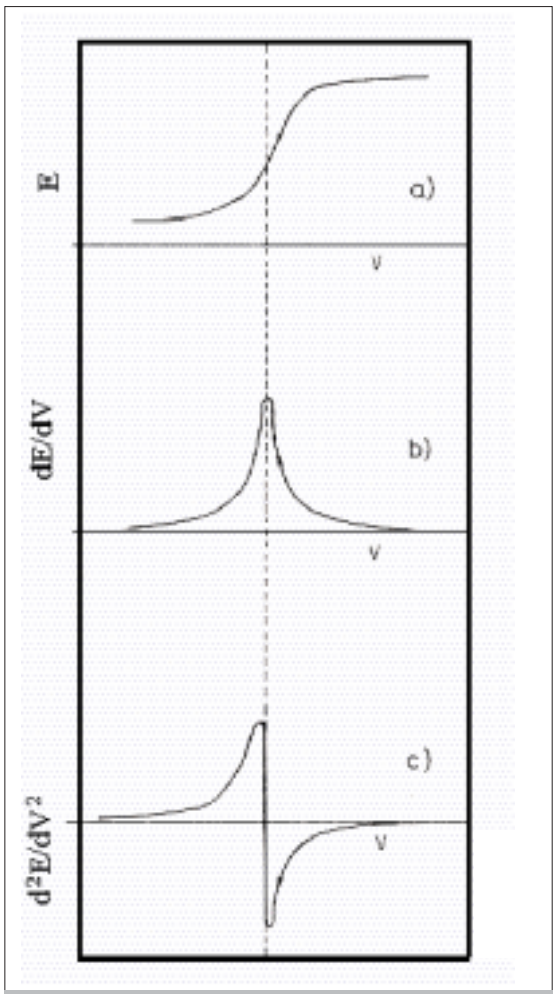


Figura 10: Curva di titolazione potenziometrica normale (a), usando la derivata prima (b), o la derivata seconda (c).

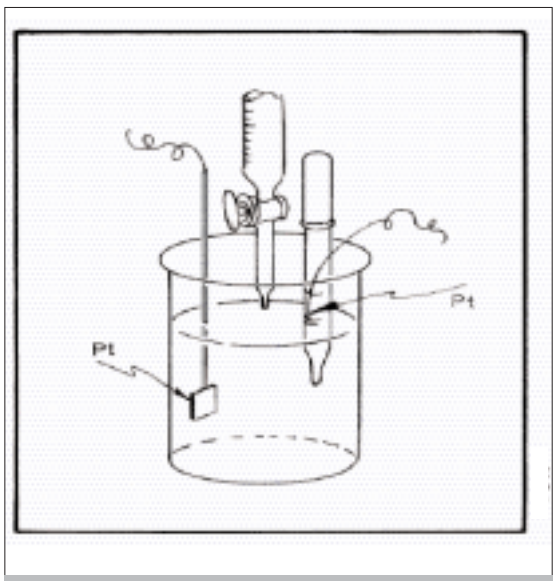


Figura 11: Apparecchiatura per titolazione potenziometrica differenziale.

di flesso. Quanto più la titolazione è accurata tanto più il punto finale coincide con il punto di equivalenza.
Il punto di flesso può essere più agevolmente individuato riportando in grafico la derivata prima e la derivata seconda della curva di titolazione (Fig. 10).
Tali curve derivate sono caratterizzate, come si vede, dalla presenza di un massimo (derivata prima) o di un punto di rapido passaggio per l'asse delle ascisse (derivata seconda) e sono più evidenti del punto di flesso.
La curva derivata prima può anche essere determinata direttamente per via sperimentale mediante la semplice apparecchiatura rappresentata in Fig. 11.
Come si vede la soluzione contenuta nel recipiente di titolazione può venire aspirata nel piccolo contagocce; successivamente si fa un'ulteriore aggiunta di reattivo e si agita la soluzione, che però non penetra all'interno del contagocce che resta escluso dall'operazione di omogeneizzazione della concentrazione delle sostanze nei vari punti della soluzione. Fra i due elettrodi indicatori perfettamente uguali, uno dei quali è immerso nella soluzione del recipiente e l'altro nella soluzione contenuta nel contagocce, essendo fra loro differenti le due soluzioni, si stabilisce una f.e.m. che consente la determinazione sperimentale, a ogni aggiunta di titolante della grandezza $\Delta E/\Delta V$ che esprime il rapporto fra la differenza dei valori del potenziale, che si rileva fra i due elettrodi dopo una certa aggiunta, e la differenza fra i volumi di reattivo aggiunti alla soluzione del recipiente ed a quella del contagocce. La soluzione contenuta nel contagocce viene quindi spurgata ed omogeneizzata con la restante soluzione. Dopo tale omogeneizzazione si aspira nuovamente un certo volume di soluzione nel contagocce e si ricomincia la serie delle operazioni descritte. È così possibile per ogni aggiunta determinare il valore $\Delta E/\Delta V$ e quindi costruire la curva derivata della curva di titolazione. La tecnica che è stata ora illustrata gode del vantaggio, rispetto alla potenziometria diretta, di non richiedere l'impiego di un elettrodo di riferimento per effettuare la titolazione.

Esempi di titolazioni potenziometriche sono le titolazioni acido-base che impiegano quale elettrodo indicatore un elettrodo sensibile allo ione idrogeno (vedi sopra), le titolazioni di ossidoriduzione che vengono eseguite con un elettrodo indicatore inerte di platino e le titolazioni di precipitazione e di complessazione. In teoria per quest'ultimo tipo di titolazioni ogni metallo potrebbe fungere da indicatore dei propri ioni in soluzione; in pratica però soltanto usando come elettrodo indicatore l'elettrodo ad argento o quello a mercurio, si possono ottenere risultati soddisfacenti. Nella routine di laboratorio le titolazioni potenziometriche vengono spesso condotte fino ad un potenziale di equivalenza precedentemente calcolato per il punto finale della titolazione. Spesso le titolazioni potenziometriche vengono eseguite mediante elettrodi bimetallici consistenti in una coppia di metalli differenti (ad esempio platino e tungsteno); con tale sistema da un lato vengono evidenziati salti di potenziale particolarmente elevati in corrispondenza del punto finale della titolazione e dall'altro si rende superfluo l'impiego del ponte salino e dell'elettrodo di riferimento.

3.3.2 Conduttometria

Le titolazioni conduttometriche sono titolazioni per le quali il punto finale viene determinato da una variazione della pendenza della curva di titolazione, ottenuta riportando la conducibilità in funzione del volume di titolante aggiunto.
Il metodo si basa sul fatto che alla reazione di titolazione partecipano alcuni ioni in numero e quantità tali da comportare, in corrispondenza dell'equivalenza, un cambiamento della pendenza della variazione della conducibilità della soluzione al procedere della titolazione stessa. Per esempio, nel caso si titoli un acido forte con una base forte prima di iniziare la titolazione la conducibilità della soluzione è determinata dall'acido: poi, man mano che si aggiunge la base e la titolazione procede, la conducibilità diminuisce, poiché in soluzione si forma un sale (il cui anione è lo stesso dell'acido, ma il cui catione è senz'altro meno conduttore dello ione idrogeno, essendo quest'ultimo più mobile) ed acqua, pressoché indissociata e, quindi, poco conduttrice.
Lo schema della titolazione considerata può, nel suo evolversi, essere così riassunto:

$$H^+ Cl^- + Na^+ OH^- \rightarrow Na^+ Cl^- + H_2O$$

1) Conducibilità iniziale dovuta a $[HC1]_a$ = a = concentrazione iniziale dell'acido;
2) Conducibilità prima dell'equivalenza $[HCl]_x + [NaCl]_y$; (x+y) = a;
3) Conducibilità all'equivalenza $\rightarrow [NaCl]_a$;
4) Conducibilità dopo l'equivalenza $\rightarrow [NaCl]_a + [OH]_b + [Na^+]_b$; b = NaOH aggiunto dopo l'equivalenza.

Come si vede, dopo l'equivalenza la conducibilità torna a crescere per la presenza in soluzione dello ione OH^- molto mobile e, quindi, ottimo conduttore. Il diagramma di titolazione avrà perciò, in questo caso, un andamento a V, il punto di inversione della pendenza rappresentando il punto finale della titolazione.
Esistono però altre forme di diagramma di titolazione conduttometrica in funzione del tipo di reazione considerata e, quindi, della qualità e del numero di ioni interessati, e della forza, quali elettroliti, delle sostanze formate. E possibile, pertanto, avere anche diagrammi ad L e ad L rovesciata, oppure con valori della derivata, cioé della pendenza, sempre dello stesso segno, ma con un punto di discontinuità: in ogni caso il punto relativo ad una variazione brusca della pendenza del diagramma di titolazione, rappresenta il punto finale della titolazione stessa, che sarà tanto più corrispondente al punto di equivalenza quanto più accurata è la titolazione.
Il sistema di misura è costituito da un ponte di Wheatstone alimentato in corrente alternata, un braccio del quale è rappresentato dalla cella di titolazione nella quale sono immersi due elettrodi di platino. Quando il ponte è bilanciato, sul quadrante dell'indicatore si legge il valore della resistenza della soluzione fra i due elettrodi. E però possibile tarare il rivelatore direttamente in valori di conducibilità, al fine di poter costruire, dai valori letti, il grafico di titolazione, senza che sia necessario alcun calcolo.

Le titolazioni conduttometriche godono del vantaggio di richiedere apparecchiature semplici, di poter essere effettuate anche in soluzioni intensamente colorate, alle quali è difficile l'applicazione di parecchie tecniche analitiche strumentali, e di essere molto rapide. Infatti per la costruzione del diagramma di titolazione, è sufficiente la determinazione sperimentale di pochi punti iniziali e di pochi punti relativi ad un forte eccesso di titolante: il punto di equivalenza viene rilevato mediante estrapolazione. Per contro esse hanno il grosso svantaggio di non poter essere effettuate in presenza di elettroliti di supporto ad elevate concentrazioni, in quanto, in tali condizioni, le variazioni di conducibilità risultano poco apprezzabili.

3.3.3 Polarografia

Il metodo polarografico per l'analisi di sostanze in soluzione consiste in un'elettrolisi, a potenziale variabile, della soluzione da analizzare. Nel caso più generale, il catodo è un elettrodo a goccia di mercurio, cioé un elettrodo la cui superficie si rinnova continuamente durante il corso dell'analisi, mentre l'anodo può essere una larga superficie di mercurio oppure un elettrodo a calomelano.
L'elettrodo a goccia di mercurio consiste di solito in un lungo tubo capillare di vetro (diametro interno 0,05 mm), unito ad un serbatoio di mercurio per mezzo di un tubo flessibile. Dalla punta del capillare, cade regolarmente una goccia di mercurio ogni 3-6 secondi. Il polarogramma è una curva potenziale-corrente ed ha una caratteristica forma a gradini, come illustrato in Fig. 12.

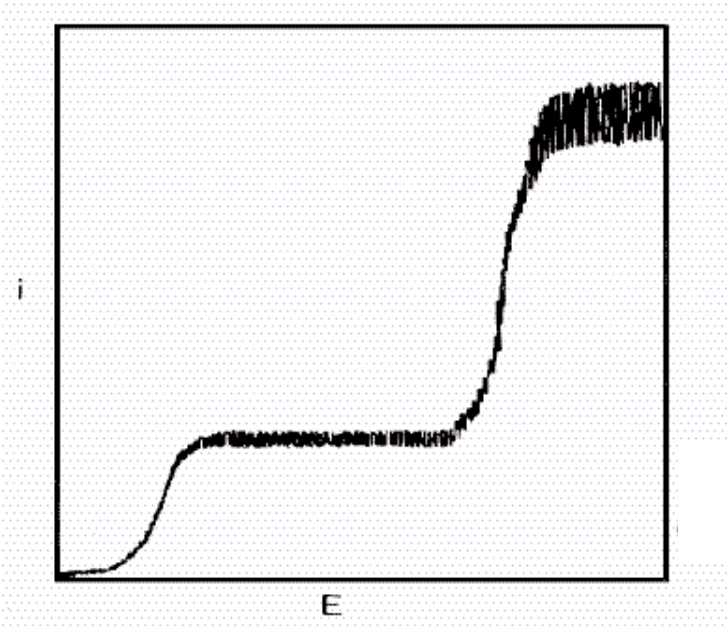


Figura 12: Esempio classico di polarogramma.

La corrente, inizialmente quasi nulla, cresce bruscamente, in corrispondenza di un determinato potenziale ed arriva rapidamente ad un valore di saturazione che non varia più sensibilmente per ulteriori aumenti del potenziale. Questo valore limite della corrente (i_d) si chiama generalmente corrente limite di diffusione e, purché il processo di riduzione dipenda solo dalla diffusione all'elettrodo e dalla specie riducibile, è proporzionale alla concentrazione di questa nella soluzione in esame; su questo fatto si basa l'applicazione della polarografia all'analisi quantitativa. Per garantire questa condizione si devono rendere nulle la corrente di migrazione e la corrente di convezione (che insieme a quella di diffusione, sono le componenti della corrente in una comune elettrolisi); ciò si realizza rispettivamente aggiungendo un elettrolita di supporto a concentrazione molto maggiore (rapporto 100:1) di quella della specie ione da dosare ed operando con la soluzione in quiete assoluta.

Molto spesso la corrente di diffusione non raggiunge il valore limite gradualmente, ma all'inizio del "plateau" di corrente si osserva un picco acuto. Tale massimo dell'onda polarografica impedisce una misura esatta dell'altezza dell'onda; di solito, per sopprimere questi massimi si addizionano alla soluzione in esame piccole quantità di sostanze tensioattive.
L'ossigeno, sempre presente nelle soluzioni acquose, può reagire all'elettrodo a goccia di mercurio e dare luogo a due riduzioni:

ad H_2O_2 a - 0,2 Volt;
ad H_2O a - 1,0 Volt.

La riduzione dell'ossigeno al microelettrodo, può così originare due gradini, che interferiscono con le onde polarografiche degli ioni ridotti nello stesso intervallo di potenziale. È pertanto quasi sempre necessario, prima di effettuare l'analisi, desossigenare la soluzione, facendo gorgogliare in essa una corrente di gas.
In relazione all'andamento di una curva polarografica, in precedenza descritto, devono farsi due importanti osservazioni:

1) in corrispondenza dei valori di potenziale meno negativi di quello di innalzamento della corrente, la corrente polarografica non è in realtà nulla: anche in queste condizioni si ha un passaggio debole di corrente. Tale corrente è detta residua e deve essere sottratta da quella limite per avere il valore corretto di questa;
2) la corrente polarografica a causa della piccola superficie degli elettrodi a goccia di mercurio, è sempre assai bassa, dell'ordine di μA.

Ciò è un fatto assai rilevante poiché, nel tempo generalmente richiesto per un'analisi polarografica, la corrente passata, trasformata attraverso la legge di Faraday in variazione di concentrazione della specie elettroattiva, dà per questa valori tanto bassi da poter ritenere costante la concentrazione dello ione in studio che si vuole determinare, per cui è possibile, sulla stessa aliquota di soluzione effettuare più prove nelle stesse condizioni della prima.

Analisi qualitativa

La polarografia viene applicata soprattutto all'analisi qualitativa delle soluzioni con tanti ioni metallici di differente natura: in molti casi è possibile con una sola prova metterli tutti contemporaneamente in evidenza.
Quando in soluzione sono presenti più specie ioniche da determinare, il polarogramma ottenuto è una tipica curva a gradini in corrispondenza dei quali la corrente subisce un brusco aumento per una piccola variazione di potenziale.
Ogni gradino (onda polarografica) corrisponde alla riduzione di una delle specie ioniche presenti in soluzione; il potenziale del suo punto di mezzo è il potenziale di semionda $E_1/_2$ caratteristico di ogni specie ionica presente, che ne permette l'identificazione (Figg. 13 e 14).
Il valore $E_{1/2}$ può essere determinato graficamente o anche calcolato per via matematica e può variare, per una stessa sostanza, con la natura dell'elettrolita di supporto.
Esistono valori tabulati di $E_{1/2}$ dei diversi cationi per diversi elettroliti di supporto, ma tuttavia nella pratica è molto utile tracciare direttamente un polarogramma di soluzioni note e metterlo a confronto con quello della soluzione incognita, ottenuto nelle stesse condizioni sperimentali.
L'importanza di una opportuna scelta dell'elettrolita di supporto è illustrata dal confronto dei dati relativi al piombo e al cadmio. Questi due cationi hanno potenziali di semigradino uguali in NaOH, ma sono assai ben separati in KCN o H_3PO_4 e meglio ancora in KCl (Tab. 6).

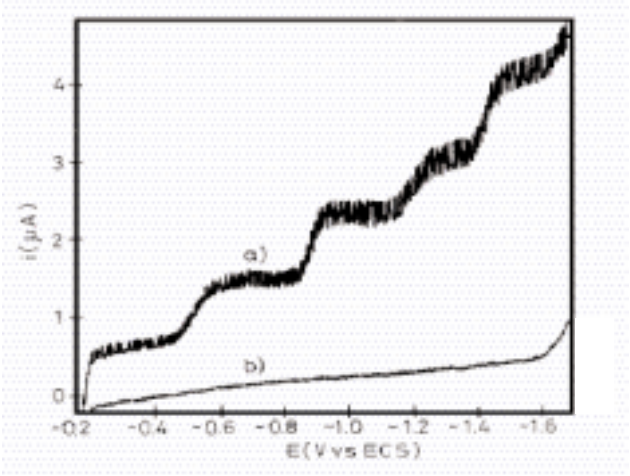


Figura 13: Esempio di polarogramma fornito da più specie elettroriducibili.

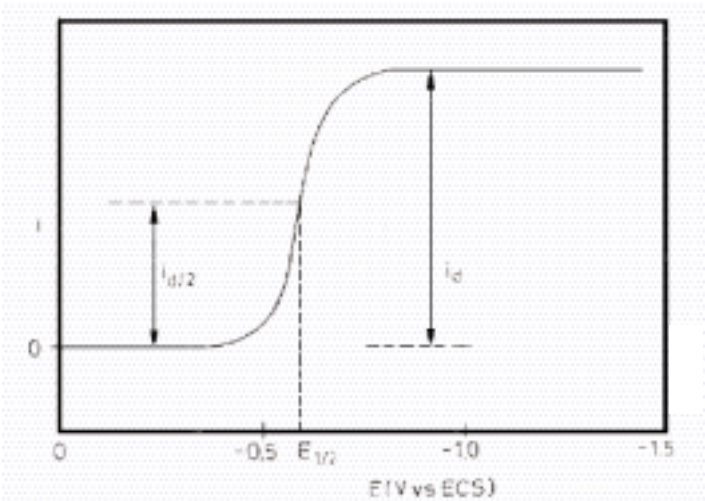


Figura 14: Determinazione del potenziale di semionda e dell'intensità della corrente di diffusione.

Tabella 6: Valori di potenziale di semigradino per alcuni cationi in vari elettroliti di supporto (vs elettrodo a calomelano saturo, ECS)

catione	supporto				
	KCl (0,1 F)	NH_3 (1 F) NH_4Cl (1 F)	NaOH (1 F)	H_3PO_4 (7,3 F)	KCN (1 F)
Cd^{2+}	-0,60	-0,81	-0,78	-0,77	-1,18 t
Co^{2+}	-1,20 t	-1,29 t	-1,46 t	-1,20 t	-1,13 t [a Co(I)]
Cr^{3+}	…..	-1,43 t [a Cr(II)] -1,71 t [a Cr(0)]	…..	-1,02 t [a Cr(II)]	–1,38 [a Cr(II)]
Cu^{2+}	+0,04 [a Cu(I)] -0,22 [a Cu(0)]	-0,24 [a Cu(I)] -0,51 [a Cu(0)]	-0,41 t	-0,09	NR§
Fe^{2+}	-1,3 t	-1,49 t	…..	…..	…..
Fe^{3+}	…..	…..	-1,12 Π [a Fe(II)] -1,74 Π [a Fe(0)]	+0,06 [a Fe(II)]	
Ni^{2+}	-1,1 t	-1,0 t	…..	-1,18	-1,36
Pb^{2+}	-1,40	…..	-0,76	-0,53	-0,72
Zn^{2+}	-1,00	-1,35 t	-1,53	-1,13 t	NR§

t: riduzione irreversibile; …..: indica insufficiente solubilità, o informazioni non del tutto esaurienti; NR§: ione non riducibile nell'ambito indicato; Π: soluzione 3 M di KOH col 3% di mannitolo; a: prodotto della riduzione

Analisi quantitativa

Le possibilità di analisi quantitativa della polarografia sono correlate alla dipendenza diretta della corrente limite netta, corretta cioè per la corrente residua, dalla concentrazione della specie elettroattiva. Se sono presenti in soluzione più specie elettroattive tale dipendenza è espressa dalla equazione di Ilkovic:

$$I_d = 607 \cdot n \cdot D^{\frac{1}{2}} \cdot m^{\frac{2}{3}} \cdot t^{\frac{1}{6}} \cdot C$$

I_d = corrente limite di diffusione espressa in microampère;
n = numero degli elettroni che partecipano alla reazione elettrodica;
C = concentrazione della specie ionica ossidata o ridotta all'elettrodo a goccia di mercurio;
t = tempo di gocciolamento, espresso in secondi, tra una goccia e la successiva;
m = massa di mercurio che fluisce dal capillare espressa in mg/sec;
D = coefficiente di diffusione espresso in cm^2/sec della specie da determinare alla cui riduzione o ossidazione è dovuta la corrente I_d.

Se sono presenti in soluzione più specie elettroattive, la corrente limite corrispondente ad ogni gradino viene misurata sottraendo al totale il contributo dato dalle precedenti.
Per determinare la concentrazione di un certo ione a partire dalla misura della corrente limite corretta esistono vari metodi, i più impiegati dei quali sono il metodo della retta di taratura e il metodo delle aggiunte.
Il metodo della retta di taratura si basa sulla costruzione di una retta nel piano concentrazione (ascisse) - corrente (ordinate): si preparano diverse soluzioni dello ione che si vuole determinare aventi concentrazioni differenti e si determina la corrente media del gradino in regime di saturazione (quando cioè essa non cresce più al crescere del potenziale, per lo meno entro un certo intervallo) per le diverse soluzioni. Si riportano i due dati uno in funzione dell'altro e si entra nella retta così ottenuta con il valore della corrente limite rilevata per la soluzione a concentrazione incognita: il valore di quest'ultima viene ricavato sull'asse delle ascisse.
Il metodo delle aggiunte consiste nell'aggiungere ad un volume noto V della soluzione a concentrazione incognita C_X un volume noto v di una soluzione a concentrazione nota C_N della stessa specie e nel rapportare i valori della corrente limite rilevati ai valori delle rispettive concentrazioni prima e dopo l'aggiunta (rispettivamente i'_{max} e i''_{max}).

$$C_X : i'_{max} = \left(C_X \frac{V}{V+v} + C_N \frac{v}{V+v} \right) : i''_{max}$$

3.3.4 Amperometria

Le titolazioni amperometriche sono titolazioni che si conducono in condizioni polarografiche, cioè quando la corrente è controllata dalla diffusione. Tali condizioni si realizzano, come si è visto, operando in quiete ed in presenza di un elettrolita di supporto la cui concentrazione sia almeno 50-100 volte maggiore di quella della specie che deve essere titolata. Le titolazioni amperometriche consistono nella misura della corrente limite di diffusione al variare nella soluzione della concentrazione della specie che si vuole determinare quantitativamente. Esse si basano sulla legge di Ilkovic che garantisce la proporzionalità diretta fra corrente polarografica limite di una certa onda e concentrazione della specie al cui processo elettrodico (catodico ed anodico) l'onda in questione viene attribuita. Durante una titolazione amperometrica è ovviamente necessario che il potenziale dell'elettrodo di lavoro al quale, cioè, avviene l'ossidazione o, come più spesso accade, la riduzione della specie da titolare, sia rigorosamente costante: ciò affinché sia lecito attribuire ogni variazione della corrente limite soltanto a variazioni della concentrazione del titolando, provocate da aggiunte del titolante.

In relazione al tipo di titolazione, che utilizza quale mezzo indicatore la corrente limite dell'elettrolisi polarografica, possono presentarsi diversi casi, cioè che:

- il titolando sia elettrochimicamente attivo – cioè dia luogo ad un processo di riduzione o di ossidazione – nel campo di potenziale esplorato ed il titolante no;
- sia attivo il titolante, ma non il titolando;
- siano attivi entrambi.

Non possono essere risolte mediante la tecnica amperometrica quelle titolazioni in cui né il titolante né il titolando siano elettrochimicamente attivi.
Ciascuno dei tre casi considerati può a sua volta, presentare due sottocasi, a seconda, cioè che il prodotto della reazione di titolazione sia attivo o inattivo al potenziale a cui si conduce l'esperienza. Nel primo di questi due sottocasi le cose si complicano alquanto e per giungere a risultati di una certa attendibilità è necessario controllare rigorosamente le condizioni sperimentali ed effettuare una saggia ed abile manipolazione dei dati ottenuti. Il secondo sottocaso, invece, è quello che quasi sempre si cerca di realizzare nei problemi analitici, in quanto di più agevole risoluzione.
Consideriamo ora i tre casi precedentemente esposti. Nel primo di essi, supponendo che la specie da titolare presente in soluzione sia A e che la specie titolante sia B, per cui alla titolazione corrisponde la reazione:

$$A + B \rightarrow AB$$

si osserverà che man mano che si aggiunge B ad A, la corrente dovuta alla riduzione (od all'ossidazione) di A diminuisce, raggiungendo un valore minimo oltre il quale le ulteriori aggiunte di B non influenzano il valore della corrente. Tale valore di corrente in assenza di altre specie diverse da A, B ed AB corrisponde – o, meglio, deve corrispondere – alla corrente polarografica residua; ove ciò non accada, la scelta del reattivo B non è stata eseguita in modo opportuno, in quanto tale reattivo non è in grado di abbassare, al di sotto del limite minimo di rivelabilità del metodo impiegato, la concentrazione di A. Per chiarire meglio questo concetto, osserviamo che A e B possono reagire insieme per formare o un composto poco solubile che precipita, oppure un complesso stabile che sposta il potenziale di scarica di A a valori tanto più negativi quanto più stabile è il complesso: nell'un caso e nell'altro A, mediante la sua reazione con B, viene posto in una forma nella quale esso, al potenziale a cui era elettrochimicamente attivo come ione semplice o solvatato, non è più in grado di ridursi od ossidarsi. Ovviamente la scelta di B è di fondamentale importanza per l'attendibilità della titolazione: B, cioè, deve essere tale che il prodotto AB sia caratterizzato da un valore molto basso del K_{ps} (prodotto di solubilità), se la reazione è una reazione di precipitazione oppure da un valore molto elevato della costante di stabilità, se la reazione stessa è una reazione di complessazione. La reazione può anche essere, meno comunemente, una reazione di ossido-riduzione: in tal caso, estendendo ad essa i concetti finora esposti, è necessario, affinchè sia garantita al massimo la quantitatività della determinazione, che i potenziali di ossido-riduzione della coppia di cui fa parte A e della coppia di cui fa parte B siano nettamente diversi.
Il grafico di titolazione, costruito riportando la corrente limite in funzione del volume di titolante aggiunto, deve tenere conto anche dell'effetto di diluizione dovuto al fatto che per l'aggiunta di un certo volume di B, la parte di A che non ha ancora reagito si trova diluita in un volume maggiore di quello di partenza. Tale effetto può essere corretto riportando in ordinata non la corrente che si misura, bensì il valore che si ottiene moltiplicando il dato sperimentale per il rapporto fra il volume totale corrispondente all'aggiunta fatta ed il volume di partenza, la differenza fra i due volumi essendo logicamente il volume di titolante fino a quel momento impiegato. L'effetto della diluizione sarà tanto più sentito quanto più è diluita la concentrazione del reattivo aggiunto. Al limite, se si usa un reattivo ad una concentrazione molto più elevata di quella della specie da dosare, l'effetto di diluizione è quasi nullo; ma, così operando, il punto finale della titolazione, cioè il volume di reattivo aggiunto fino all'equivalenza, è rilevabile con scarsa precisione.
Il grafico di titolazione, corretto come detto sopra, risulterà, nel caso che stiamo considerando (A elettrochimicamente attivo, B no), a forma di L, il punto di discontinuità rappresentando il punto finale della titolazione.

Nel secondo caso (B elettrochimicamente attivo, A no) la curva di titolazione è ad L rovesciato: infatti finchè reagisce con A, B non può rimanere come tale in soluzione e quindi reagisce all'elettrodo di lavoro. Dopo il punto di equivalenza, invece, l'eccesso di B può ridursi (od ossidarsi) al potenziale prescelto, per cui sarà possibile rilevare una corrente di intensità crescente al crescere del volume di B aggiunto.
Nel terzo caso (A e B elettrochimicamente attivi), infine, l'andamento del grafico risulterà del tipo del primo caso fino al punto di equivalenza, cioè fino a quando in soluzione prevale A e del tipo del secondo caso dopo l'equivalenza, cioè quando in soluzione prevale B; ne risulterà un diagramma a V, il punto di inversione della pendenza rappresentando il punto finale della titolazione.
I tre casi sono illustrati dalla Fig. 15.

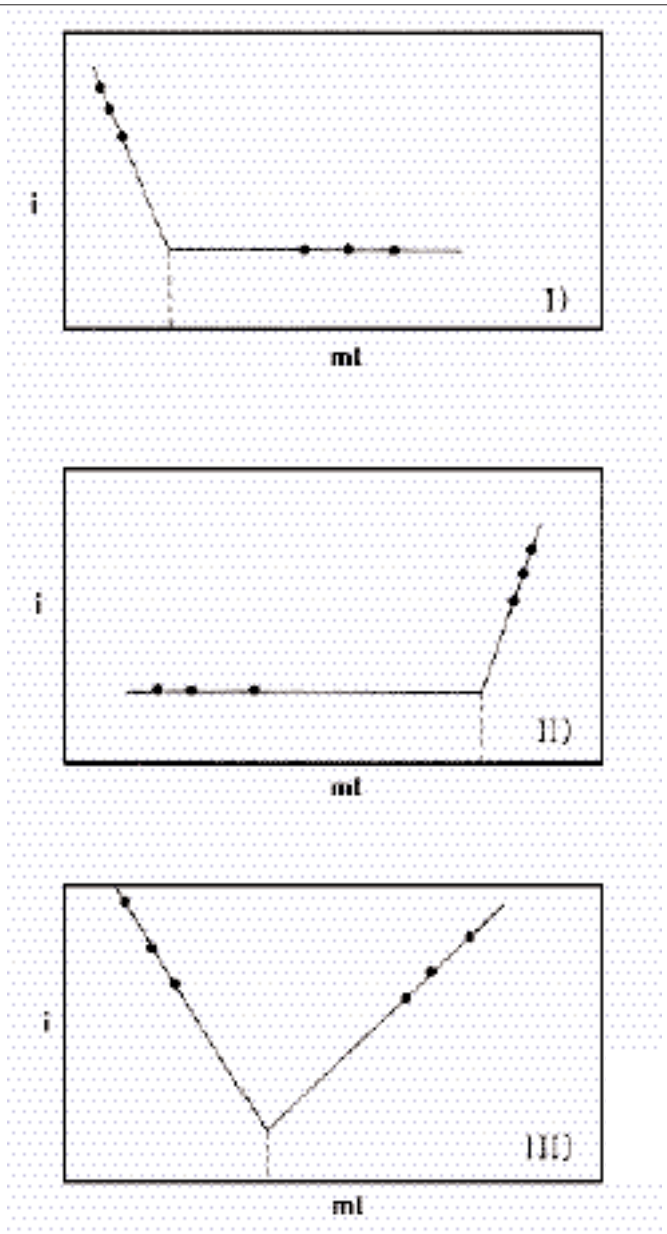


Figura 15: Grafico di titolazione della sostanza A con la sostanza B. I) A elettrochimicamente attivo, B no; II) B elettrochimicamente attivo, A no; III) A e B elettrochimicamente attivi.

Poiché il punto finale della titolazione – che quanto più questa è accurata tanto più corrisponderà al punto di equivalenza – viene individuato come si è visto attraverso una varia-

zione di pendenza, nelle titolazioni con grafico a V, per le quali questa variazione è maggiore, si hanno in genere risultati più attendibili che negli altri due casi.
Nelle titolazioni amperometriche i punti più rappresentativi al fine di individuare il punto di equivalenza sono quelli lontani da esso, per i quali gli equilibri in soluzione vengono a stabilirsi più rapidamente, essendo in eccesso una delle due specie interessate alla reazione di titolazione, e consentono di prescindere parzialmente dalle rigide considerazioni di quantitatività all'equivalenza, precedentemente fatte a proposito della scelta del reattivo B: è opportuno perciò effettuare le misure in forte eccesso di titolando ed in forte eccesso di titolante.

3.4 Metodi cromatografici

La cromatografia è un metodo di separazione e di analisi di natura prettamente fisica caratterizzato dal fatto che le sostanze vengono separate sulla base di un differente coefficiente di distribuzione fra due fasi, immiscibili tra loro, delle quali una è fissa e l'altra mobile.
La cromatografia è quindi un particolare tipo di separazione mediante distribuzione tra due fasi, analogo all'estrazione in controcorrente dove però entrambe le fasi sono mobili. A seconda dello stato di aggregazione della fase fissa, si parlerà di cromatografia di adsorbimento e cromatografia di partizione.
Nella prima la fase stazionaria è un solido, nella seconda un liquido; quindi, se si conduce un'esperienza cromatografica ad elevata temperatura utilizzando una fase stazionaria liquida, anche se questa a temperatura ambiente è solida, parleremo di cromatografia di partizione.
Sia la cromatografia di adsorbimento che quella di partizione possono a loro volta essere distinte in due classi: cromatografia liquida, con fase mobile liquida, e cromatografia gassosa, con fase mobile gassosa. Si può pertanto fare il seguente quadro riassuntivo (Tab. 7):

Tabella 7: Quadro riassuntivo dei metodi cromatografici

	Fase mobile	Tipo di cromatografia
PARTIZIONE (fase stazionaria liquida)	L G	LL LG
ADSORBIMENTO (fase stazionaria solida)	L G	SL SG

Esistono inoltre tecniche in cui il fenomeno cromatografico è accoppiato ad un altro di varia natura: si parla allora di elettrocromatografia (fenomeno cromatografico accoppiato all'effetto di un campo elettrico) oppure cromatografia per scambio ionico (la fase stazionaria oltre che a funzionare da fase cromatografica, contiene dei gruppi suscettibili di scambio con gruppi presenti nelle soluzioni da analizzare).

3.4.1 Cromatografia su carta

È un caso particolare della cromatografia liquido-liquido (LL) dove la fase mobile è un liquido, generalmente un solvente organico o una miscela di solventi, mentre la fase fissa è costituita da un altro liquido, acqua, adsorbito da un supporto inerte (carta per cromatografia sono le Whatman e le Schleicher e Schull).
La cromatografia su carta può essere condotta secondo le tecniche ascendente o discendente, che, a loro volta, possono essere mono o bidimensionali. In quella discendente il solvente eluente cade dall'alto verso il basso mentre nell'altra sale dal basso. La differenza sostanziale sta nel fatto che, delle tre forze che si compongono nel processo (effetto cromatografico, effetto di flusso, effetto di gravità) nel caso della tecnica ascendente l'effetto di gravità si oppone alla forza di flusso ed agevola l'effetto cromatografico, mentre nel caso della discendente si verifica il contrario.
La cromatografia ascendente viene preferita nel caso di solventi molto mobili o quando, a causa della presenza di specie assai simili, è necessario allungare sensibilmente i tempi di esperienza.

Per la realizzazione pratica di una cromatografia monodimensionale discendente si utilizzano strisce di carta alla cellulosa sulle quali viene praticato un segno orizzontale a 3-4 cm da uno degli estremi. Al centro di tale segno si pone una quantità di soluzione contenente circa 100 mg di sostanza.
Si piega un estremo della striscia (Fig. 16) e lo si fa pescare in una vaschetta dalla quale per capillarità e gravità percola il solvente, generalmente di natura organica, che eluisce le sostanze sulla striscia trascinandole verso il basso tanto più facilmente quanto più facilmente le solubilizza. Quindi, a seconda di come le sostanze da analizzare si distribuiscono tra la fase acquosa e la fase organica, il cammino da esse percorso sulla striscia è più o meno lungo.

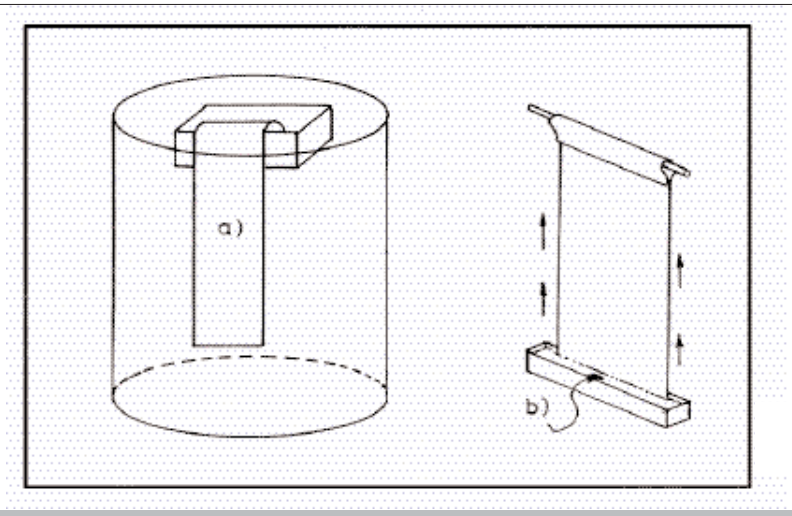


Figura 16: Apparecchiatura per cromatografia su carta discendente (a) e ascendente (b).

Si definisce R_f il rapporto tra il cammino percorso dal solvente e quello percorso dalla sostanza. Tanto maggiore è tale valore tanto più la sostanza è solubile nella fase organica; al contrario, tanto minore è l'R_f tanto più la sostanza è solubile nella fase acquosa. Per la scelta del solvente da impiegare nella separazione di una sostanza si fa generalmente riferimento alla sua polarità. Solventi molto polari interagiscono di solito con sostanze polari di analoga struttura molecolare, mentre solventi poco polari o non polari interagiscono con composti poco polari o non polari di struttura simile. In base a tali osservazioni, per la separazione dei costituenti una miscela, la scelta dell'eluente viene fatta sulla base di una serie eluotropica in modo da ottenere valori di R_f diversi da uno e da zero. Nel caso di ioni metallici, poiché, come è noto, essi sono scarsamente solubili nelle fasi organiche al contrario delle loro forme complesse, a volte, per separare tra loro due ioni, si sfrutta la diversa stabilità dei loro complessi con uno stesso ligando.
Nel caso della cromatografia bidimensionale, il processo cromatografico viene effettuato lungo due direzioni, impiegando generalmente due solventi diversi. Tale tecnica viene generalmente impiegata per miscele complesse in cui le varie sostanze non riescono ad essere convenientemente separate per mezzo di un'unica miscela eluente. Il campione da analizzare viene posto nell'angolo sinistro del foglio di carta (20x20 cm) e si esegue la separazione cromatografica con un primo solvente. Quando il fronte del solvente sarà giunto a due centimetri dal bordo superiore del foglio, lo si toglie dalla vaschetta cromatografica, lo si asciuga con aria calda e lo si immerge in un'altra vaschetta cromatografica contenente un secondo solvente, normalmente alla direzione precedente (Fig. 17).
Alcuni accorgimenti generali da adottare nel corso della cromatografia su carta sono:

- condurre l'esperienza in una campana previamente saturata con i vapori del solvente organico che si vuole utilizzare;
- sciogliere la sostanza da analizzare in un opportuno solvente volatile, quindi, posta la soluzione nel punto di applicazione prefissato, evaporare il solvente;
- interrompere l'eluizione prima che il solvente abbia raggiunto il limite superiore della striscia di carta.

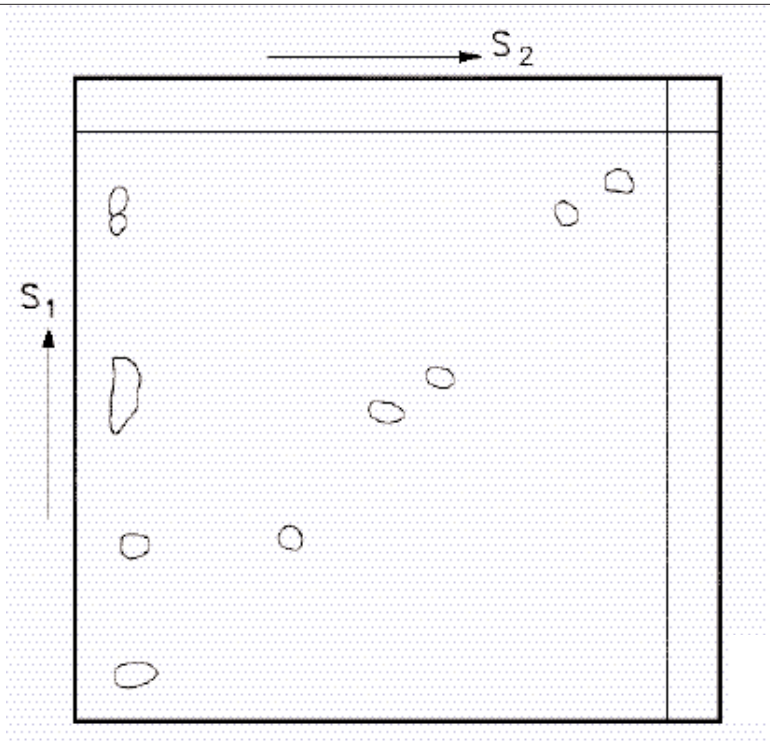


Figura 17: Esempio di cromatogramma bidimensionale.

Terminata la separazione, si estrae la carta e la si fa asciugare con aria calda o in stufa e la si sviluppa, la si spruzza cioè con soluzioni di opportuni reattivi (rivelatori) che reagiscono con le sostanze da analizzare. La fase di sviluppo è quella che ha dato il nome alla cromatografia giacché si basa sulla formazione di macchie colorate dovute a prodotti di reazione fra le sostanze in esame ed il rivelatore.
Il metodo cromatografico su carta può dare informazioni sia qualitative che quantitative; per l'analisi qualitativa sono sufficienti le colorazioni sviluppatesi per azione degli appositi reattivi ed i valori degli R_f; per l'analisi quantitativa invece si possono utilizzare due metodi. Il primo consiste nel tagliare la zona della carta corrispondente alle varie macchie e nell'estrarre dalla carta stessa, con un opportuno solvente, la sostanza che poi viene quantitativamente determinata allo spettrofotometro con misure colorimetriche. Il secondo metodo consiste nell'analizzare la striscia di carta con un microdensitometro misurando l'assorbimento della luce da parte della carta. Alle zone colorate della macchia corrispondono dei massimi di assorbimento. Questi massimi vengono rilevati sotto forma di picchi, la cui area può essere presa, in prima approssimazione, come espressione della quantità di sostanza che ha dato luogo alla macchia colorata letta.

3.4.2 Cromatografia su strato sottile

La cromatografia su strato sottile è un metodo microanalitico che si è notevolmente affermato, perchè ha reso possibili separazioni non attuabili con la cromatografia su carta e perchè ha trovato estese e numerosissime applicazioni, sia su scala analitica che preparativa. Permette di estendere le tecniche della cromatografia su carta agli adsorbenti usati nella cromatografia su colonna e può così assommare i principali vantaggi delle altre due tecniche.
Il limite minimo di rivelabilità è notevolmente aumentato rispetto alla cromatografia su carta e, nei casi più favorevoli, può raggiungere 10^{-9} grammi (ng). Il tempo di esecuzione è notevolmente ridotto (da qualche ora a 20-40 minuti); la natura inorganica del supporto permette l'uso di rivelatori più energici, non sempre applicabili su carta.
È una tecnica molto simile alla cromatografia su carta per quanto riguarda le modalità ope-

rative (applicazione del campione, rivelazione, determinazione, ecc.); viene generalmente condotta secondo il metodo ascendente mono e bidimensionale.
Per quanto concerne i principi che regolano il frazionamento, il processo cromatografico è di ripartizione, se lo strato applicato sulla lastra è polvere di cellulosa, di adsorbimento se lo strato è costituito da gel di silice o allumina.
Si possono comunque preparare lastre con scambiatori ionici o con polimeri porosi e in questi casi il processo cromatografico sarà di scambio ionico o di gel permeazione.

3.4.3 Cromatografia su colonna

Per realizzare una cromatografia con quantità di sostanza maggiore di quella dosabile mediante cromatografia su carta o su strato sottile, si applica la tecnica della cromatografia su colonna.
Nella cromatografia su colonna il riempimento è effettuato con un solido, generalmente a granulometria di 100-200 mesh, per evitare sia un flusso troppo lento sia effetti di diffusione e di non equilibrio, mentre la fase mobile è un liquido più o meno polare. Il processo cromatografico può essere di partizione, o di adsorbimento.
La maggior parte dei solidi comunemente impiegati si trova in commercio e, nel caso di adsorbenti, questi, prima di essere posti nella colonna, vanno attivati in stufa in modo da eliminare l'acqua adsorbita. Dopo l'attivazione riempire la colonna, che può essere di vetro o di metallo ed il cui diametro varia a seconda del tipo di separazione da effettuare, supportando la fase solida su un filtro appoggiato su un setto poroso o su un batuffolo di lana di vetro, avendo cura di effettuare il riempimento in modo uniforme.
Il campione in esame va quindi posto sulla sommità della colonna il più uniformemente possibile, usando soluzioni concentrate per evitare la stratificazione non uniforme della sostanza in esame.
L'eluizione viene effettuata alimentando in continuo la colonna con la fase mobile, posta in un serbatoio di vetro in modo tale che il solvente scenda per effetto di gravità.
Quando il riempimento della colonna è effettuato con un supporto tale che il processo cromatografico sia di ripartizione (LL) (fase stazionaria costituita da un liquido adsorbito da un supporto solido), generalmente il solvente più polare è quello adsorbito sul solido (fase stazionaria) mentre l'eluizione viene condotta con il solvente meno polare (fase mobile). Nel caso contrario (fase stazionaria meno polare della fase mobile) si realizza la tecnica cromatografica detta cromatografia a fasi inverse.
L'eluizione può essere semplice, impiegando cioè lo stesso solvente fino alla completa separazione dei costituenti la miscela, oppure a gradino, utilizzando in sequenza solventi diversi appartenenti ad una serie eluotropica (solventi disposti secondo un ordine crescente di polarità e quindi secondo la loro capacità di agire come eluenti nel frazionamento di una miscela), scelti in ordine crescente di potere eluente, oppure ancora a gradiente, alimentando cioè la colonna inizialmente con un solvente a basso potere eluente al quale in seguito viene aggiunto un secondo solvente avente maggiore potere eluente e la cui composizione percentuale cresce linearmente nel tempo. Con questa tecnica, impiegata per la separazione dei costituenti di miscele complesse, si ottiene una buona separazione in tempi relativamente brevi.
Una volta ottenuta su colonna la separazione desiderata, interrotto il flusso, le sostanze separate ed evidenziate con opportuni rivelatori, possono essere estratte con solventi, dopo estrusione della colonna, oppure si può procedere col metodo dell'eluizione a zone raccogliendo, con un collettore di frazioni, aliquote di ugual volume. In entrambi i casi l'esame dell'eluato può essere effettuato determinando mediante metodi colorimetrici o spettrofotometrici la concentrazione delle sostanze nelle varie frazioni. La determinazione quantitativa dell'analita può anche essere eseguita in continuo, analizzando gli eluati all'uscita della colonna, senza frazionarli, con l'impiego di metodi fisici o chimici.
Modificazioni alla tecnica sopra descritta (che costituisce la cromatografia liquida classica) hanno portato allo sviluppo della moderna cromatografia liquida.

3.4.4 Cromatografia di permeazione su gel

Tecnica cromatografica assai efficace per la separazione di specie ad elevato peso molecolare, dal punto di vista operativo ripete i metodi della cromatografia su colonna.
Viene effettuata utilizzando come fase stazionaria polimeri organici ad alto peso molecolare, caratterizzati da un elevato numero di pori di larghe dimensioni. Le molecole presenti nel campione da analizzare ed aventi dimensioni maggiori dei pori non possono entrarvi e quindi vengono eluite con il volume morto della colonna, mentre quelle con dimensioni minori entrano nei pori e vengono di conseguenza trattenute dalla colonna, dalla quale sono poi eluite in funzione delle loro dimensioni.
La fase solida, costituita da polimeri reticolati, ha la caratteristica di rigonfiarsi a contatto col solvente, assumendo un aspetto gelatinoso ed aumentando notevolmente di volume. Può essere idrofila, ed in tal caso per l'eluizione si impiegano soluzioni acquose o solventi molto polari (diossano, alcoli, ecc.) oppure idrofoba e quindi come fase mobile si utilizzano solventi poco polari o apolari.
La gel permeazione, oltre che per il frazionamento di macromolecole, può essere utilizzata per separare macromolecole da molecole semplici in soluzioni contenenti elettroliti, sostituendo vantaggiosamente la dialisi (tempi molto più brevi).

3.4.5 Cromatografia a scambio ionico

Tecnica cromatografica impiegata per la separazione di specie ioniche o di sistemi che assumono o modificano la loro carica in presenza di un opportuno reattivo.
La fase stazionaria è costituita dagli scambiatori ionici, composti macromolecolari con gruppi ionici o facilmente ionizzabili (cariche fisse) le cui cariche sono bilanciate da controioni (cariche mobili) (Fig. 18).

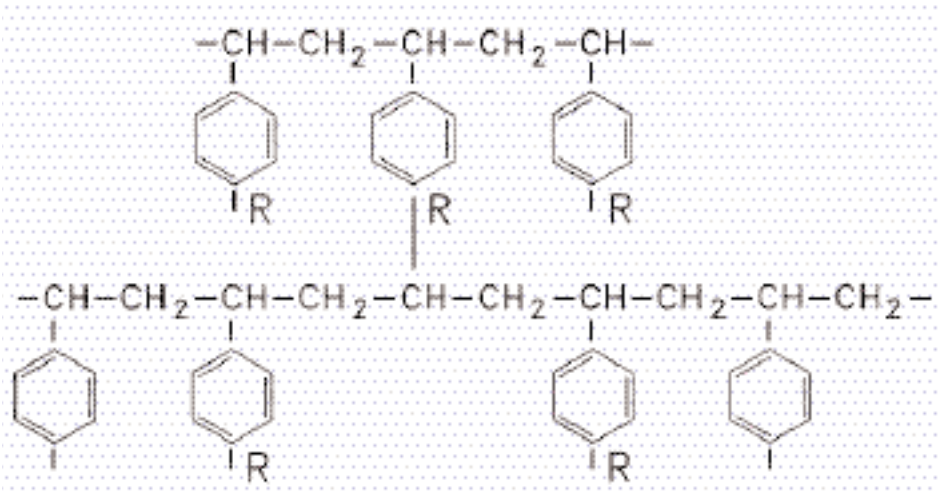


Figura 18: Schema di uno scambiatore ionico. R = —SO_3H, —COOH negli scambiatori cationici; R = —NH_2, —NR_3OH negli scambiatori anionici.

Le tecniche operative sono quelle della cromatografia su colonna, ma il principio su cui è basata la separazione è di natura sia chimica che fisica.
Gli scambiatori ionici si dividono in scambiatori cationici o anionici, che a loro volta si suddividono in scambiatori forti o deboli.

<u>Scambiatori cationici</u>

I radicali —SO_2OH e —CH_2SO_2OH legati al nucleo conferiscono allo scambiatore proprietà fortemente acide; oltre a questi radicali le resine fenol-formaldeidiche prodotte in passato

contengono ossidrili fenolici. Gli scambiatori del tipo meno recente sono quindi bifunzionali, cioè hanno più di un tipo di gruppo ionizzabile; in soluzioni fortemente alcaline si ionizzeranno sia i gruppi acidi fenolici che quelli solfonici.
Poichè tutti i gruppi ionizzabili legati alla resina contribuiscono alla sua attività, gli scambiatori fenolici non sono utilizzabili in soluzioni aventi pH superiore a 8-8,5. In soluzioni più alcaline si può avere un logorio che comporta una forte perdita di resina. Le più recenti resine a scambio cationico a base polistirenica sono monofunzionali e possono essere usate in intervalli notevolmente ampi di pH senza rischio di perdite.
Gli scambiatori debolmente acidi contengono il gruppo carbossilico —COOH; le loro proprietà si avvicinano strettamente a quelle di un acido debole insolubile; essi possono essere tamponati ed è possibile ottenere qualsiasi rapporto sale-acido libero, mediante trattamento dello scambiatore con un grande eccesso di un'appropriata miscela tampone. Questa proprietà rende possibile lo scambio ionico a pH controllato.
Gli scambiatori cationici sono generalmente usati in due forme, forma di acido libero o idrogenionica e la forma di sale, spesso di sale sodico o ammonico; la forma idrogenionica trattiene i cationi e lascia libera una equivalente quantità di ioni idrogeno nella soluzione, mentre col sale sodico vengono trattenuti i cationi e viene lasciata libera una quantità equivalente di ioni sodio.
I potenziali di scambio di cationi su uno scambiatore fortemente acido sono influenzati da numerosi fattori, fra i quali i più importanti sono le dimensioni degli ioni, la valenza e la concentrazione.
In soluzioni diluite i potenziali di scambio aumentano con l'aumentare della valenza come è illustrato dalla seguente serie di alcuni ioni metallici in soluzione 0,1 N dei loro cloruri, a 25°C salvo diverse indicazioni.

$Th^{4+}(NO_3) > Fe^{3+} > Al^{3+} > Ba^{2+} > Tl^{+}(SO_4) = Pb^{2+} > Sr^{2+} > Ca^{2+} > Co^{2+} > Ni^{2+} = Cu^{2+} > Zn^{2+} = Mg^{2+}$
$> UO_2^{2+}(NO_3) = Mn^{2+} > Ag^{+} > Cs^{+} > Be^{2+}(SO_4) = Rb^{+} > Cd^{2+} > NH_4^{+} = K^{+} > Na^{+} > H^{+} > Li^{+} > Hg^{2+}$

In soluzioni concentrate l'effetto della valenza è inverso; infatti la ritenzione degli ioni monovalenti è favorita rispetto agli ioni polivalenti. Questo spiega perchè nel processo di addolcimento dell'acqua, il calcio e il magnesio vengono eliminati in grande misura dall'acqua trattata (che è una soluzione diluita), mentre sono facilmente asportati dallo scambiatore con una soluzione concentrata di cloruro sodico usata come rigenerante.
In generale, perchè lo scambio ionico sia efficace, occorre che l'affinità dello ione per la resina sia notevolmente più grande di quella dello ione che si trova già assorbito.
I potenziali di scambio di uno scambiatore debolmente acido seguono un ordine simile, però mostrano una selettività maggiore per alcuni cationi bivalenti e un'affinità molto alta per gli ioni idrogeno.
L'ordine per alcuni ioni comuni è il seguente:

$H^{+} > Ca^{2+} > Mg^{2+} > Na^{+}$

Uno scambiatore carbossilico debolmente acido in soluzione avente pH inferiore a 5 esiste quasi interamente sotto forma di acido libero e poiché il gruppo carbossilico è ionizzato solo debolmente, la capacità di scambio effettiva per altri cationi è molto piccola. Soltanto in soluzioni neutre o alcaline gli scambiatori debolmente acidi hanno una capacità effettiva.
Questa differenza fra gli scambiatori cationici fortemente acidi e quelli debolmente acidi può essere ulteriormente illustrata dalle seguenti equazioni dove R rappresenta la matrice.

A) Scambiatore

Resina fortemente acida

$$R.SO_2OH + NaCl \rightleftarrows R.SO_2ONa + HCl$$
$$R.SO_2OH + NaHCO_3 \rightleftarrows R.SO_2ONa + CO_2 + H_2O$$

B) Scambiatore

Resina debolmente acida

$$R.COOH+NaCl \rightleftarrows R.COONa+HCl$$
$$R.COOH+NaHCO_3 \rightleftarrows R.COONa+CO_2+H_2O$$

La forma idrogenionica dello scambiatore cationico fortemente acido reagisce facilmente con i sali di acidi sia forti che deboli; con il sale di un acido molto debole l'equilibrio è spostato nettamente verso destra, poichè il numero dì idrogenioni liberati è piuttosto scarso.
Lo scambiatore debolmente acido, invece, reagisce con i sali di acidi forti solo parzialmente poichè gli idrogenioni liberati spostano l'equilibrio nettamente verso sinistra. Entrambi i tipi di scambiatori reagiscono con i sali di acidi deboli e possono essere neutralizzati con alcali caustici.

$$R.SO_2OH+NaOH \rightleftarrows R.SO_2ONa+H_2O$$
$$R.COOH+NaOH \rightleftarrows R.COONa+H_2O$$

Scambiatori anionici

Gli scambiatori anionici devono le loro proprietà al gruppo amminico e ai gruppi amminici sostituiti nella struttura della resina. La forza basica della resina dipende in particolare dalla natura del gruppo attivo ed anche dalla sua posizione. Per esempio un gruppo amminico legato al nucleo conferisce carattere meno basico di un gruppo amminico legato ad una catena laterale.
Gli scambiatori anionici, debolmente basici hanno gruppi amminici, e gruppi amminici mono e bisostituiti, mentre il gruppo ammonico quaternario dà luogo a scambiatori fortemente basici, con forza paragonabile a quella degli alcali caustici.
Come nel caso degli scambiatori cationici, i meno recenti tipi di scambiatori anionici, basati su resine fenoliche, contenevano anche gruppi ossidrilici; gli ultimi progressi in questo campo hanno portato a tipi di scambiatori anionici a base polistirenica aventi soltanto un tipo di gruppo funzionale basico.
La scala dei potenziali di scambio anionico è meno nota di quello cationico. La valenza sembra abbia la medesima influenza e gli scambiatori debolmente basici differiscono da quelli fortemente basici per l'affinità molto alta per gli ioni ossidrile; gli scambiatori debolmente basici possono essere usati soltanto in soluzioni neutre o acide, poichè in soluzione alcalina hanno una capacità di scambio piccola o nulla.
La seguente serie delle affinità degli anioni più comuni è dovuta a Kunin e a Myers:

SO_4^{2-} > CrO_4^{2-} > citrati > tartrati > NO_3^- > $As_3O_3^{3-}$ > PO_4^{3-} > MoO_4^{2-} > acetati > I^- > Br^- > Cl^- > F^-

In tutti i processi di scambio ionico la velocità di scambio è un parametro della massima importanza: in genere è preferibile che essa sia alta. Numerosi fattori influenzano la velocità di scambio: di questi i più importanti sono la natura della matrice dello scambiatore, le dimensioni e la concentrazione degli ioni che devono essere scambiati.
Diminuendo le dimensioni delle particelle ed aumentando la porosità della resina si ottiene un aumento della velocità di scambio e ciò fa pensare che essa dipenda da un processo di diffusione.
La porosità di uno scambiatore a base polistirenica dipende dal numero dei legami incrociati esistenti nella struttura della resina; questo a sua volta dipende dalla quantità di divinilbenzene usato nel processo di fabbricazione.
Comunque la selettività di uno scambiatore molto poroso è inferiore a quella di una resina meno porosa con molti legami incrociati; quindi nel processo di fabbricazione di una resina di utilità generale si cerca di giungere ad un compromesso fra le opposte esigenze di alta selettività e alta velocità di scambio.
La Tab. 8 fornisce un quadro sintetico delle caratteristiche degli scambiatori.

Tabella 8: Caratteristiche degli scambiatori cationici e anionici

	Scambiatori cationici		Scambiatori anionici	
Gruppo funzionale	Fortemente acidi Acido solfonico	Debolmente acidi Acido carbossilico	Fortemente basici Ammonio quaternario	Debolmente basici Gruppo amminico
Effetto dell'aumento del valore del pH sulla capacità	Nessun effetto	Aumenta	Nessun effetto	Diminuisce
Stabilità dei sali	Stabile	Idrolizzano per lavaggio	Stabile	Idrolizzano per lavaggio
Conversione dei sali alla forma di acido libero o di base libera	Richede un eccesso di acido forte	Prontamente rigenerato	Richiede un eccesso di NaOH	Prontamente rigenerato con sodio carbonato o ammoniaca
Velocità di scambio	Alta	Bassa, a meno che non sia ionizzato	Alta	Bassa, a meno che non sia ionizzato

La cromatografia a scambio ionico viene generalmente eseguita su colonna riempita con scambiatori scelti in relazione alle esigenze analitiche. L'eluizione è condotta con acidi, basi, tamponi o solventi a seconda della natura delle sostanze che si vogliono separare. La resina, una volta introdotto il campione, scambia i propri ioni con quelli della soluzione, ma questi ultimi, per le proprietà di selettività sopra ricordate, vengono trattenuti in maniera diversa. Quelli verso i quali lo scambiatore è più affine vengono scambiati nella parte alta della colonna, per gli altri lo scambio avverrà via via più in basso. Introducendo successivamente l'eluente gli ioni verranno eluiti con una velocità che è inversamente proporzionale all'affinità dello scambiatore per lo ione scambiato, per cui gli ioni meno fissati, localizzati nelle zone inferiori, saranno raccolti per primi. Le singole frazioni verranno in seguito sottoposte a conferme analitiche.
I vari "step" attraverso cui si esplica il processo cromatografico possono essere quindi così riassunti:

- equilibrazione dello scambiatore;
- trattenimento sullo scambiatore dell'anione o catione in esame con scambio del controione;

$$SO_3^-H^+ + Me^+ \rightarrow SO_3^-Me^+ + H^+$$

- spiazzamento dello ione legato, durante la fase di eluizione con un opportuno eluente;

$$SO_3^-Me^+ + H^+Cl^- \rightarrow SO_3^-H^+ + Me^+ + Cl^-$$

- rigenerazione della colonna.

3.4.6 Gascromatografia

Tecnica cromatografica che permette la determinazione quantitativa e qualitativa di un gran numero di sostanze, presenti anche in miscele complesse, purché possano essere portate allo stato di vapore senza decomporsi o trasformate in specie volatili.
La fase mobile è costituita da un gas o da un vapore e la fase stazionaria da un liquido o un solido.
La fase mobile gassosa è detta gas-trascinatore (oppure "carrier"); la colonna che contiene la fase fissa è detta di partizione o di adsorbimento a seconda che contenga come fase stazionaria un liquido o un solido. Nelle colonne di partizione la fase liquida stazionaria deve essere supportata su un solido inerte. Le varie sostanze componenti una miscela analizzata in gascromatografia vengono rilevate sotto forma di picchi sul diagramma (gascromatogramma) tracciato dal registratore dell'apparecchio impiegato (Fig. 19).

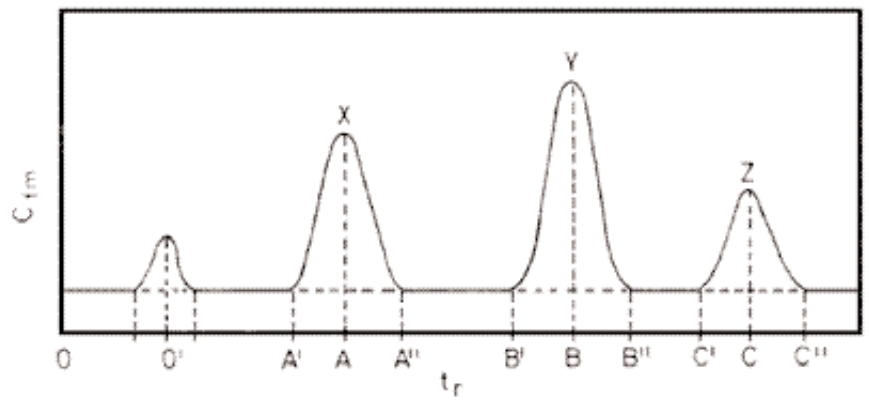


Figura 19: Diagramma fornito da una miscela analizzata in gascromatografia.

In questo diagramma, poiché il rivelatore analizza proprio la fase mobile che esce dalla colonna, in ordinate è riportata la concentrazione della sostanza in fase mobile e in ascisse il tempo a partire dall'introduzione del campione. Ad ognuno dei picchi corrisponde una sostanza. La caratteristica di ogni sostanza è la distanza OA, OB, OC ecc., cioè il tempo passato dal momento in cui è stata immessa la miscela nella colonna (punto 0) al momento in cui la sostanza fuoriesce alla massima concentrazione. Tale tempo è detto tempo di ritenzione perchè rappresenta la ritenzione di ogni sostanza all'interno della colonna. Il tempo di ritenzione può essere espresso anche sotto forma di volume di ritenzione V_r, il quale rappresenta il volume di gas trascinatore che è fuoriuscito prima che esca la sostanza che si considera. Il tempo e il volume di ritenzione sono correlati attraverso il flusso F

$$V_r = \Phi \cdot t_r$$

Pertanto in ascisse del cromatogramma si può riportare a volte anche il volume di ritenzione, a patto, però, che il flusso sia mantenuto costante per tutta la durata dell'analisi. I tempi e i volumi di ritenzione così misurati vanno, però, corretti del tempo morto, che rappresenta il tempo che un gas non trattenuto impiega per attraversare la colonna. Tale tempo morto varia con la lunghezza, la natura e il riempimento della colonna per cui va determinato sperimentalmente e poi sottratto da tutti i tempi di ritenzione: si aggiunge allora alla miscela da analizzare sempre una sostanza gassosa (a volte si usa il gas di città), se ne registra il picco, se ne prende il tempo o volume di ritenzione (00') e si sposta lo zero da 0 a 0'; i nuovi valori dei tempi (o volumi) di ritenzione vengono definiti come tempi (o volumi) di ritenzione corretti.
Il tempo (volume) di ritenzione è funzione della temperatura a cui è stata condotta l'esperienza, del tipo di colonna utilizzata (di partizione o di adsorbimento), della natura della fase di adsorbimento o di partizione usata, della lunghezza della colonna, del tipo di gas trascinatore impiegato, del suo flusso. La diversa ripartizione delle varie sostanze fra la fase mobile e quella fissa è quantitativamente rappresentata dai differenti valori del coefficiente di distribuzione delle sostanze fra le due fasi:

$$K = \frac{C_s}{C_{fm}}$$

in cui:

C_{fs} = concentrazione della sostanza nella fase stazionaria;
C_{fm} = concentrazione della sostanza nella fase mobile;
K è un numero puro nel caso della cromatografia di partizione, ha le dimensioni volume/massa nel caso della cromatografia di adsorbimento; infatti la fase mobile (gas) si misura volumetricamente e la fase fissa (solido) gravimetricamente.

Nel seguito vengono indicate le principali operazioni tecniche implicate nella gascromatografia, mentre in Fig. 20 viene riportato uno schema classico di gascromatografo.
Prima dell'introduzione del campione si regola il flusso del gas di trasporto e la temperatura della camera termostatica, che deve essere scelta in base al punto di ebollizione dei componenti la miscela da analizzare. Normalmente una diminuzione della temperatura della colonna cromatografica porta ad un miglioramento della separazione ma anche ad un corrispondente prolungamento dei tempi di analisi.

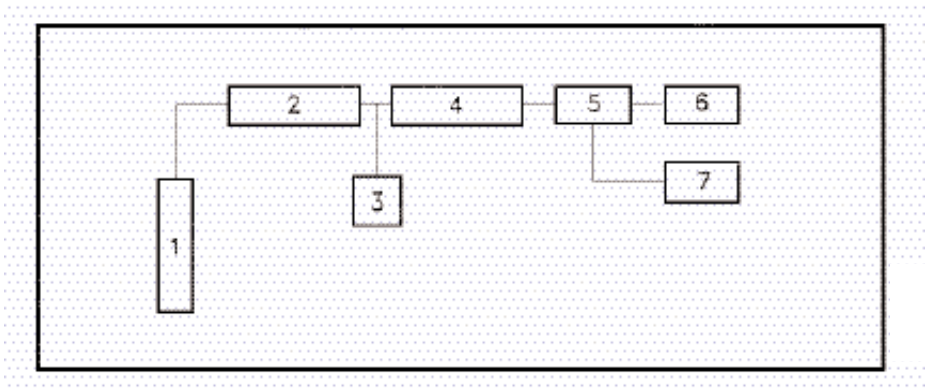


Figura 20: Schema di un gascromatografo. 1. bombola con gas di trasporto; 2. regolatore di flusso; 3. iniettore; 4. camera termostatica con colonna; 5. rivelatore; 6. flussimetro; 7. registratore.

Un buon compromesso è rappresentato dalla scelta di una temperatura intermedia ai valori dei punti di ebollizione dei componenti la miscela. Nel caso in cui questa sia costituita da composti aventi temperature di ebollizione molto diverse, si può procedere operando non più in condizioni isoterme, ma a temperatura programmata, sottoponendo cioè la camera termostatica contenente la colonna ad un regolare incremento della temperatura.
La velocità del gas di trasporto non è un fattore molto critico; tuttavia a velocità troppo basse o troppo alte i picchi potrebbero tendere ad allargarsi o a restringersi eccessivamente sia per un fenomeno di diffusione sia per un imperfetto raggiungimento dell'equilibrio.
Si introduce quindi il campione tramite l'iniettore che, poichè le sostanze da analizzare debbono essere in fase gassosa, deve trovarsi ad una temperatura tale da consentire la vaporizzazione del campione stesso. La miscela (in fase vapore) viene convogliata dalla fase mobile nella colonna lungo la quale sono frazionati i vari costituenti. All'uscita dalla colonna il rivelatore analizza la fase mobile e fornisce un segnale proporzionale alla quantità di ciascun componente presente.
Il gas di trasporto, che costituisce la fase mobile, deve essere chimicamente inerte, di elevata purezza e di bassa viscosità. Quello più comunemente impiegato è l'azoto, che può però essere sostituito da idrogeno, elio, argon a seconda del tipo di rivelatore impiegato.
Per quanto concerne le colonne, queste possono essere suddivise in due categorie:

- colonne impaccate;
- colonne capillari.

Le prime hanno diametro interno di 2-5 mm e lunghezza variabile (1-10 m). Sono costituite da un tubo di vetro, di acciaio inossidabile o di rame avvolto a spirale o piegato ad U e riempito con la fase stazionaria sotto forma di granuli aventi dimensioni tali da permettere una distribuzione uniforme ed una buona permeabilità.
Le seconde sono costituite da tubi di acciaio o di vetro del diametro di 0,2-0,5 mm, lunghezza 20-100 m, avvolti a spirale, le cui pareti sono ricoperte uniformemente dalla fase stazionaria.
Tali colonne, utilizzate per analisi di miscele complesse, consentono di operare in tempi relativamente brevi e con pressione del gas di trasporto notevolmente bassa, inoltre hanno un ottimo potere risolutivo.
I materiali adsorbenti più comunemente impiegati per il riempimento delle colonne sono:

- carboni attivi e carboni grafitati;
- allumina e gel di silice;
- setacci molecolari;
- polimeri porosi.

mentre quelli di supporto più comuni sono:

- farina fossile calcinata e purificata;
- palline di vetro;
- granuli di teflon.

La quantità di campione che deve essere introdotta nell'apparecchio va stabilita di volta in volta con una prova preliminare a seconda della composizione qualitativa e quantitativa della miscela da analizzare.
A titolo orientativo, operando con colonne impaccate, l'operatore si può attenere alle indicazioni riportate in Tab. 9.

Tabella 9: Quantità di campione orientativamente necessario a seconda del tipo di analisi da effettuare

Campione da analizzare	Numero dei componenti	Quantità di campione da introdurre nell'apparecchio
Gas	3 - 4	1 - 2 cm^3
	10 - 12	1 - 5 cm^3
Liquidi con punto di ebollizione fino a 110°C	5	0,02 - 0,03 cm^3
	10	0,03 - 0,04 cm^3
	15	0,04 - 0,05 cm^3
Liquidi con punto di ebollizione fino a 180°C	5	0,04 - 0,05 cm^3
	10	0,04 - 0,05 cm^3
	15	0,06 - 0,07 cm^3
Liquidi con punto di ebollizione oltre 180°C	5	0,05 - 0,07cm^3
	10	0,06 - 0,08 cm^3
	15	0,08 - 0,10 cm^3

L'ampiezza dei picchi può essere variata introducendo una quantità maggiore o minore di campione oppure intervenendo sul commutatore di sensibilità. Come norma generale, è sempre bene introdurre la minima quantità di campione compatibilmente con la sensibilità o la stabilità dell'apparecchio: un aumento eccessivo della quantità del campione porta sempre ad un allargamento dei picchi e ad una conseguente minore risoluzione fra due picchi adiacenti, nonchè ad una dissimmetria dei picchi stessi.
Per quanto riguarda i rivelatori la principale caratteristica da prendere in esame è la selettività.
I rivelatori possono essere divisi in:

a) rivelatori a ionizzazione;
b) rivelatori elettrochimici;
c) rivelatori spettroscopici;
d) rivelatori radiochimici;
e) rivelatori a conducibilità termica;
f) rivelatore a massa (ITD).

a) rivelatori a ionizzazione
I rivelatori e a ionizzazione maggiormente utilizzati sono i seguenti:

- rivelatori a ionizzazione di fiamma d'idrogeno ("Flame ionization detector", FID);
- rivelatori a fotoionizzazione ("Photoionization detector", PID);
- rivelatori a cattura d'elettroni ("Electrone capture detector", ECD);
- rivelatori termoionici o a ionizzazione di fiamma all'alcali ("Thermoionic ionization detector", TID, o "Alkali flame ionization detector", AFID).

b) rivelatori elettrochimici
I rivelatori elettrochimici possono a loro volta utilizzare i principi della coulometria ("Coulometric detectors"), della conduttometria ("Electrolytic conductivity detectors") e della potenziometria ("Ion selective detectors").

c) rivelatori spettroscopici
Utilizzano i principi della spettroscopia di emissione o della spettroscopia di assorbimento o della spettrometria di massa.

d) rivelatori radiochimici
Tra questi occorre ricordare i rivelatori basati sulla misura degli isotopi nell'analisi per attivazione neutronica.

e) rivelatori a conducibilità termica
Rivelatore non specifico, non distruttivo utile nell'analitica preparativa.

f) rivelatore a massa (ITD)
Basato sui principi della spettrometria di massa e in grado di identificare composti incogniti e di confermare la presenza di composti sospettati.

Interpretazione del tracciato cromatografico

a) Analisi qualitativa
L'interpretazione del tracciato cromatografico viene effettuata paragonando la posizione di ogni picco rispetto a quella di campioni contenenti soluzioni di riferimento analizzate nelle stesse condizioni sperimentali.
La posizione di un picco nel cromatogramma può essere espressa in termine di volume di ritenzione. Il volume di ritenzione è il volume di gas di trasporto fluito attraverso la colonna, in quelle determinate condizioni, dal momento dell'introduzione del campione a quello della massima risposta del registratore (apice del picco).
Poiché le misure vengono effettuate a flusso costante è uso comune esprimersi in termini di "tempo di ritenzione", secondo quanto detto sopra.
Nella determinazione del tempo di ritenzione, valori assoluti hanno significato soltanto quando sono stati introdotti tutti i fattori di correzione dovuti alle diverse condizioni sperimentali. Purtroppo in letteratura non vi sono ancora elenchi completi di composti con tempo di ritenzione corretto, quindi le indicazioni dei diversi autori hanno tutte un significato molto relativo. Normalmente però nei lavori di routine la sequenza dei picchi è sempre la stessa, per cui una volta determinata la posizione di ogni componente rispetto ad un componente base, non è poi necessario ripetere sempre le prove di identificazione.

b) Analisi quantitativa
La determinazione quantitativa viene effettuata misurando l'altezza dei picchi nel caso delle colonne capillari, e l'altezza o l'area dei picchi nell'altro caso.
La misura dell'altezza è il metodo più semplice, ma non consente di avere dati perfettamente riproducibili in quanto l'altezza dei picchi, oltre che per il valore della corrente del rivelatore e la sensibilità del registratore, varia in funzione della temperatura, del flusso del gas di trasporto, del materiale cromatografico, della lunghezza della colonna e della composizione percentuale della miscela.
L'uso dell'altezza dei picchi come indicazione quantitativa è quindi vantaggiosa solo nei casi in cui non si richiede una grande precisione nel dato.
La misura delle aree, quando non si dispone di un integratore, può essere effettuata tramite un planimetro oppure più semplicemente approssimando il picco ad un triangolo e determinandone l'area moltiplicando la sua altezza per la larghezza misurata a metà altezza (Fig. 21).
Poiché la misura deve essere effettuata con la massima precisione, si consiglia di usare un calibro o, meglio ancora, una lente millimetrata.

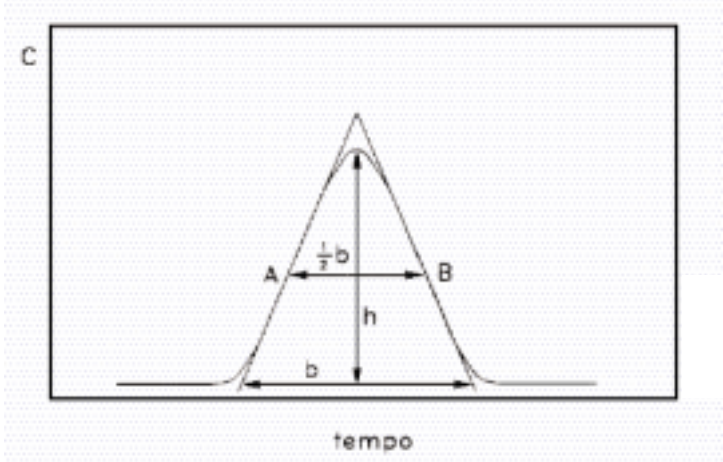


Figura 21: Misura approssimata dell'area del picco. AB = ampiezza a mezza altezza.

Quando i picchi non sono competamente separati, l'area di ogni picco viene calcolata come se il triangolo fosse completo, estrapolando a zero i due lati interrotti.
Una volta calcolata l'area dei picchi, la quantità di sostanza presente può essere determinata o mediante taratura, o col metodo della normalizzazione interna o ancora con quello del riferimento interno.
Nel primo caso si costruisce per ciascun componente la miscela un grafico, iniettando nella colonna quantità esattamente misurate della sostanza in esame e riportando le aree in funzione della concentrazione.
Nel secondo caso si sommano le aree di tutti i picchi e si rapporta a 100 l'area di ogni singolo picco. Nel caso in cui la risposta del rivelatore non sia uguale per tutti i componenti la miscela, bisogna moltiplicare le aree di ogni singolo componente per un proprio fattore di correzione.
Nel terzo caso, infine, si aggiunge al campione in esame una quantità esattamente nota di un composto (riferimento interno) non presente nella miscela, scelto in modo tale che il suo picco sia vicino ma ben separato da quello dei composti in esame, e se ne calcola l'area. Le concentrazioni dei composti in esame vengono calcolate rapportando l'area del picco corrispondente a quella del riferimento interno.

3.4.7 Cromatografia liquida ad alta prestazione o HPLC

Tecnica che permette di ottenere separazioni rapide di miscele complesse, con risoluzione paragonabile o maggiore di quella della gascromatografia, anche con composti non volatili.
I principi teorici su cui si basa sono quelli della gascromatografia; la fase stazionaria può essere costituita da un solido o da un liquido mentre la fase mobile (liquida) viene fatta fluire sotto pressione (fino a 500 atmosfere) operando generalmente a gradiente di eluizione.
I riempimenti della colonna, di vetro o di acciaio inossidabile, con diametro interno da 2 a 6 mm e lunghezza variabile (10-25 cm) possono essere:

- materiali porosi con pori profondi ed elevata area superficiale; permettono di operare con quantità relativamente grandi di sostanza;
- materiali porosi in superficie, formati da un nucleo inerte non poroso ricoperto da un sottile film poroso. Presentano bassa area superficiale e permettono di operare con piccole quantità di campione;
- fasi stazionarie chimicamente legate al supporto, ottenute o per diretta esterificazione dei gruppi OH della silice con un alcool o per silanizzazione di questi con dimetilsilano.

I rivelatori comunemente impiegati sono fotometrici nel visibile e nell'UV e a indice di rifrazione.
L'interpretazione del tracciato cromatografico sia qualitativa che quantitativa è analoga a quella riportata per la gascromatografia.

3.4.8 Cromatografia ionica

Una tecnica analitica, sviluppatasi negli ultimi anni e che assume un'importanza rilevante nella risoluzione di problemi relativi alla separazione e determinazione qualitativa e quantitativa di ioni e acidi organici aventi un pK minore di 7, è la cromatografia ionica.
La strumentazione analitica è quella tipica della HPLC dove la colonna cromatografica è riempita con resine scambiatrici cationiche o anioniche e la rivelazione è effettuata tramite un rivelatore conduttometrico preceduto da una seconda colonna, avente la funzione di soppressore di fondo.
Fino all'introduzione della "cromatografia ionica" da parte di Small et al. (1975) l'approccio cromatografico strumentale per la determinazione di ioni inorganici non aveva dato risultati soddisfacenti in quanto, molte specie ioniche, non contenendo gruppi cromofori o elettrofori, non possono essere rivelate con i normali "detector" quali quelli spettrofotometrici, a fluorescenza ed elettrochimici.
D'altra parte un'ulteriore limitazione nell'applicazione dello scambio ionico nelle moderne tecniche di cromatografia liquida derivava dalla natura degli eluenti impiegati i quali, essendo sostanzialmente costituiti da elettroliti forti, con la loro elevata conducibilità provocano un segnale di fondo troppo elevato.
Nel cromatografo ionico invece, una seconda colonna a scambio ionico, posta in serie alla colonna cromatografica e prima del rivelatore conduttometrico, funziona da soppressore del segnale di fondo diminuendo la conducibilità dovuta all'eluente, in quanto, lo trasforma da una specie ad elevata conducibilità in una a bassa conducibilità. Gli elementi impiegabili possono essere carbonati, bicarbonati, borati, ftalati, ecc.
A titolo di esempio prendiamo in esame una determinazione di anioni; le reazioni che avvengono nelle diverse fasi dell'analisi possono essere cosi schematizzate:

colonna di separazione

$$\underset{\text{resina}}{-NR_3^+} + \underset{\text{eluente}}{HCO_3^-} + NaAnione \rightarrow \underset{\text{specie ad elevata conducibilità}}{NR_3^+\,Anione^-} + NaHCO_3$$

colonna soppressore di fondo

$$\underset{\text{resina}}{-SO_3^-H^+} + \underset{\text{eluente}}{NaHCO_3} \rightarrow SO_3^-Na^+ + \underset{\text{specie a bassa conducibilità}}{H_2CO_3}$$

inoltre

$$-SO_3^-H^+ + \underset{\text{proveniente dalla colonna di separazione}}{NaAnione} \rightarrow SO_3^-Na^+ + \underset{\text{specie ad elevata conducibilità}}{H^+Anione^-}$$

$NaHCO_3$, Na_2CO_3 o NaOH, utilizzati quali eluenti nell'analisi, vengono trasformati in H_2CO_3 o H_2O che, essendo poco dissociati, hanno bassa conducibilità; inoltre l'anione in esame viene trasformato nel corrispondente acido eliminando così la necessità di avere una serie di curve di taratura a seconda della combinazione catione-anione. Altro effetto del soppressore è quello di consentire la separazione di specie per cromatografia di esclusione.
Fino ad ora il numero di cationi separati e determinati con tale tecnica è di circa trenta, mentre assai maggiore è il numero degli anioni.
Per quanto riguarda l'analisi delle acque la tecnica sopra descritta è stata applicata sia all'analisi di acque potabili che all'analisi di effluenti industriali. Ha inoltre trovato applicazioni nel campo delle piogge acide.

Concludendo, i vantaggi rappresentati dalla cromatografia ionica possono essere così riassunti:

- elevata sensibilità; vengono infatti rivelati ioni presenti a livello di μg/L senza preconcentrazione del campione;
- linearità nella risposta;
- influenza trascurabile della matrice e del pH;
- rapidità di esecuzione da cui il suo impiego in analisi di tipo routinario;
- controllo non più a carico della diffusione (lenta), quindi processo più rapido all'interno dello scambiatore.

3.4.9 Elettrocromatografia

È una tecnica cromatografica in cui l'azione adsorbente della carta si combina con quella di un campo elettrico, applicato a 90 gradi rispetto al flusso del solvente. La presenza del campo elettrico esalta le differenze di migrazione degli ioni, che si localizzeranno in punti diversi in relazione all'azione cromatografica esercitata dalla carta ed al campo elettrico applicato. La rivelazione avviene con reattivi specifici, come nel caso della cromatografia su carta. Le tecniche elettrocromatografiche sono di due tipi: discontinue e continue. Nel primo caso si opera in genere su una striscia di carta, ai cui estremi è applicata la differenza di potenziale. Gli elettrodi non si pongono sulla carta ma nella soluzione base contenuta nei compartimenti anodico e catodico, elettricamente isolati l'uno dall'altro. Generalmente si applica agli elettrodi una tensione continua stabilizzata e costante, che provoca una corrente costante o variabile nel tempo a seconda delle condizioni sperimentali. La striscia è imbevuta con la soluzione base, mentre la soluzione da esaminare è aggiunta al centro della striscia in piccolo volume.
I metodi per condurre l'elettrocromatografia discontinua si distinguono poi in metodi a camera umida ed in metodi con eliminazione dell'evaporazione, a seconda che la striscia venga appesa libera a formare una V invertita o tesa libera in posizione orizzontale (Fig. 22) oppure, rispettivamente, chiusa fra due supporti solidi (di vetro, plastica o cellophane) siliconati o raffreddati, o immersa in un liquido di raffreddamento non polare, non miscibile con la soluzione dell'elettrolita di supporto e buon conduttore del calore.

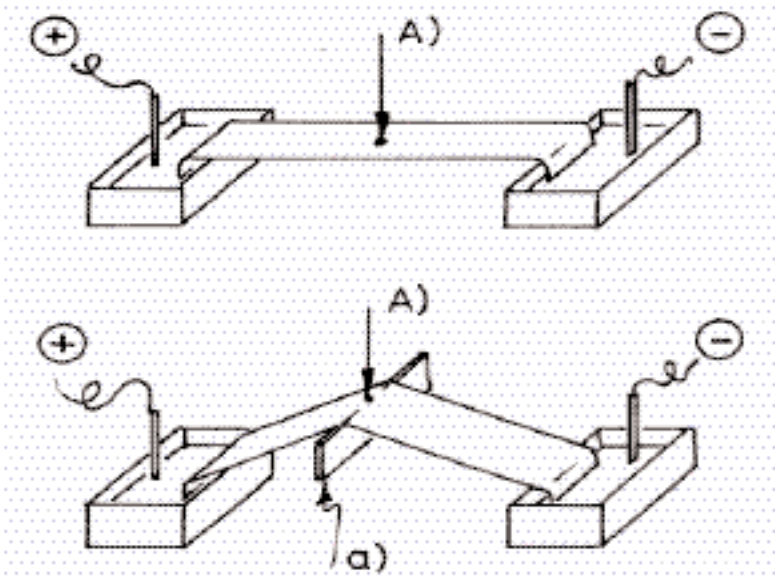


Figura 22: Apparecchiature per elettrocromatografia discontinua. A) punto di immissione del campione; a) sostegno.

La tecnica continua si esegue su un foglio di carta pressoché quadrato sul quale sono distesi gli elettrodi. La soluzione da analizzare viene introdotta in continuo mediante un capilla-

re, al centro del foglio in alto, mentre l'elettrolita di supporto fluisce continuamente dall'alto per tutta la larghezza del foglio trascinando verso il basso il miscuglio da separare. L'estremità inferiore della carta è tagliata secondo un profilo seghettato ed, in condizione ideale, in corrispondenza di ogni dente è collocata una provetta per la raccolta del singolo componente (Fig. 23).

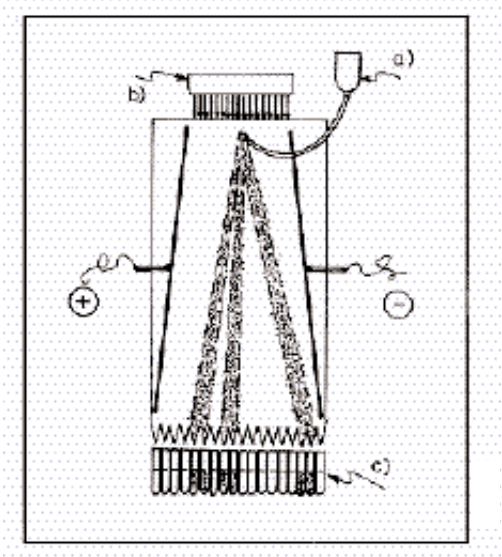


Figura 23: Apparecchiatura per elettrocromatografia continua. a = serbatoio del campione; b = serbatoio dell'eluente; c = raccoglitori.

In effetti questo sistema può essere applicato anche all'analisi elettrocromatografica bidimensionale discontinua: in questo caso però il campione non viene rifornito in continuo, ma "una tantum" all'inizio dell'analisi (Fig. 24).

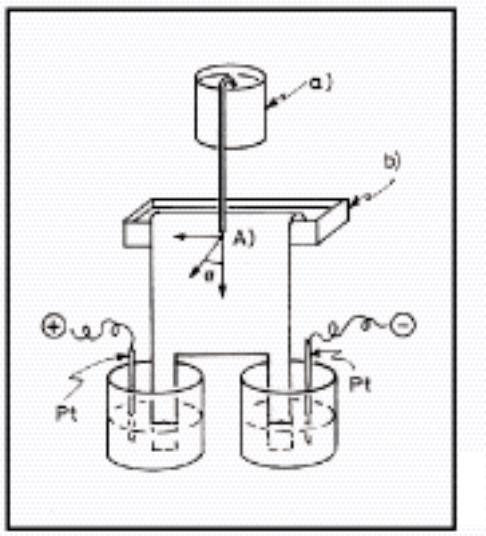


Figura 24: Apparecchiatura per analisi elettrocromatografica discontinua bidimensionale. a = serbatoio del campione; b = serbatoio dell'eluente; A = punto di immissione del campione.

3.5 Metodi per attivazione neutronica

L'attivazione neutronica è un metodo di analisi che si applica alla determinazione di elementi presenti in minima quantità. Deve la sua diffusione allo sviluppo delle tecniche nucleari e

consiste nel rendere radioattivo un nuclide dell'elemento da dosare e nel rilevare poi la presenza di questo attraverso la misura della quantità di radiazione emessa.
Nell'interno dei reattori nucleari le reazioni di fissione dell'uranio e del plutonio producono un gran numero di neutroni. Questi a loro volta, dopo essere stati rallentati dagli urti contro gli atomi del "moderatore" del reattore (i neutroni appena prodotti dalla scissione sono infatti veloci e non adatti a produrre fissioni), urtano nuovi nuclei di uranio o plutonio producendo nuove fissioni. Una piccola parte di questi neutroni può essere utilizzata in un reattore per attivare un certo elemento. Per ottenere l'attivazione è sufficiente introdurre l'elemento nel moderatore, che in molti reattori è costituito da grafite, in un punto attraversato da molti neutroni. Allora alcuni di questi, invece di urtare e venire assorbiti da nuclei di uranio o plutonio, verranno assorbiti dai nuclei dell'elemento da dosare. Saranno cioè sottratti al processo che mantiene in funzione il reattore; entro certi limiti, ciò non arresta la reazione a catena che sta alla base del funzionamento del reattore stesso.
Quando un neutrone urta un nucleo di X possiede una certa probabilità di venire assorbito. Supponiamo che X abbia un nucleo costituito da n protoni e m neutroni e quindi di peso (n+m); sottoposto a un flusso di neutroni può catturare un neutrone supplementare. La carica del nucleo evidentemente non cambia, in quanto il neutrone non possiede carica e quindi non ne apporta al nucleo. Tuttavia il neutrone possiede una unità di massa atomica e quindi il nuovo nucleo possiede un peso superiore (m+n+1). Si è così prodotto un isotopo artificiale di X. In queste condizioni però il nuovo nucleo è instabile, non riesce cioè a tenere bene legati a sé tutti i neutroni. Perciò, uno dei neutroni (non necessariamente quello che si è aggiunto) si trasforma in protone emettendo un elettrone. Questo processo cambia evidentemente la carica del nucleo il quale, avendo ceduto un elettrone, non ha subito una perdita apprezzabile della sua massa (l'elettrone possiede una massa trascurabile in confronto a quella del protone e del neutrone), ma ha perso una unità di carica negativa e appare quindi carico di una unità positiva in più.
Questa trasformazione non avviene immediatamente dopo che l'atomo di X ha assorbito il neutrone; il nucleo di X instabile resta in vita per un certo tempo, gli isotopi prodotti nell'irraggiamento si conservano per un certo tempo. Prima o poi, però, essi sono destinati a trasformarsi tutti nell'elemento Y il cui nucleo ha carica (n+1) e massa (m+n+1). Conoscendo le caratteristiche del reattore e il tempo di irraggiamento, possiamo sapere con sicurezza la percentuale di atomi radioattivi prodotti. Per conoscere la concentrazione di X nel campione di partenza, dobbiamo contare gli atomi radioattivi prodotti: ciò si realizza misurando l'emissione di raggio che accompagna la trasformazione di X radioattivo in Y.
Perciò, appena estratto il campione dal reattore, lo si introduce nella camera di misura di uno strumento, lo spettrometro per raggi gamma, che permette di registrare e contare il numero di raggi emessi da tutti i nuclei di X che subiscono il processo di disintegrazione radioattiva o, almeno, da una percentuale nota di essi. Nel giro di qualche ora si conosce il numero degli atomi radioattivi contati, da questo quanti atomi di X radioattivo si sono formati nel campione analizzato e quindi quanti atomi di X stabile si trovano nello stesso campione prima dell'attivazione.
Vi sono, ovviamente, molte precauzioni da prendere per eseguire misure di questo tipo, ed è bene conoscerne almeno una fondamentale: nel campione costituito da vari elementi è probabile che, oltre ad X, anche numerosi altri elementi vengano attivati dal bombardamento di neutroni. Le radiazioni che dovessero venire emesse da questi ultimi potrebbero disturbare il conteggio di quelle che devono servire a rivelare la presenza e l'abbondanza di X. Per questo motivo si procede generalmente ad una separazione preliminare dei costituenti il campione.
In conclusione, la misura della quantità di un elemento chimico ottenuto per attivazione procede nel modo seguente:

- si trasforma una percentuale nota di nuclei stabili dell'elemento da cercare in nuclei radioattivi;
- si conta una percentuale nota di raggi emessa dai nuclei radioattivi che vanno disintegrandosi;
- da questi valori numerici si risale al numero di tutti gli atomi presenti nel campione analizzato.

L'analisi per attivazione si può applicare a sostanze in forma solida, liquida o gassosa; un campione di pochi milligrammi (o anche meno) è sufficiente per eseguire una misura precisa.
Il metodo è estremamente sensibile e per certi elementi permette di dosare tracce che nessun metodo chimico è in grado di rilevare. La sensibilità dipende dal flusso di particelle usate per l'attivazione, dalla loro energia, dalla sezione d'urto della reazione considerata, dall'abbondanza isotopica del nuclide attivato, dal fattore di saturazione ottenuto nell'irraggiamento e dal tipo di radioattività indotta.
L'impiego di queste tecniche comporta rischi e pericoli diversi da quelli comunemente considerati in un laboratorio chimico: è pertanto necessario prendere opportune precauzioni sulla base di osservazioni e considerazioni di esperti qualificati ed in ogni caso effettuare il controllo sulle radiazioni che possono venire assorbite da ogni singolo ricercatore e tecnico addetto all'analisi.

3.6 Spettrometria di massa

La spettrometria di massa consente di individuare molecole gassose cariche (ioni) in funzione della loro massa. Tali ioni vengono prodotti per collisione fra le molecole del gas da analizzare (se la sostanza è solida deve essere previamente vaporizzata) ed elettroni accelerati tanto da produrre l'estrazione di uno o più elettroni dalle orbite più esterne degli atomi costituenti le molecole suddette. Gli ioni prodotti vengono estratti per mezzo di un elettrodo accelerante carico negativamente, mentre le residue molecole gassose non ionizzate vengono rimosse con una pompa aspirante tenuta in funzione per tutta la durata dell'esperienza.
Gli ioni positivi sono convogliati in una camera a vuoto mediante l'applicazione di un potente campo magnetico il quale conferisce ad essi traiettorie circolari, le cui curvature, per un certo valore del campo magnetico e di campo elettrico applicati, sono funzione del rapporto fra la massa dello ione e la carica dell'elettrone. Infatti, a seguito della loro accelerazione da parte del campo elettrico, gli ioni acquistano un'energia pari al prodotto della carica dello ione per la differenza di potenziale applicata V. Tale energia deve anche essere uguale all'energia cinetica degli ioni stessi, per cui se la massa di uno ione è m e v è la sua velocità sarà:

$$n\,e\,V = \frac{1}{2} m\,v^2$$

da cui risulta

$$v = \sqrt{\frac{2V\,e\,n}{m}}$$

Accelerati dal campo elettrico e opportunamente selezionati a seconda dei valori della velocità, gli ioni vengono sottoposti, come si è detto, ad un campo magnetico di intensità H che li obbliga a percorrere traiettorie circolari di raggio r esercitando su di essi una forza costante $F = H \cdot n \cdot e \cdot v$.
Mentre gli ioni percorrono tale traiettoria la loro forza centrifuga

$$\frac{mv^2}{r}$$

equilibra esattamente la forza magnetica alla quale sono sottoposti

$$H \cdot n \cdot e \cdot v = \frac{mv^2}{r}$$

da cui:

$$n\frac{e}{m} = \frac{v}{H \cdot r}$$

ed essendo

$$v = \sqrt{2V\frac{e \cdot n}{m}}$$

sarà:

$$n\frac{e}{m} = \frac{\sqrt{2V\frac{e \cdot n}{m}}}{H \cdot r}$$

cioè:

$$m = \frac{H^2 r^2 n \cdot e}{2V}$$

Queste due ultime equazioni consentono di rilevare come per valori dati di H e V il raggio della traiettoria circolare dipenda soltanto dal rapporto fra la massa e la carica dello ione e come quindi da una misura di r si possa determinare, nota la carica, anche la massa.
Viceversa, ed è quello che si fa nei comuni spettrografi di massa, si può, disponendo per come è costruito l'apparecchio di un solo valore di r utile a portare gli ioni sul sistema di rivelazione, focalizzare successivamente su tale sistema ioni caratterizzati da valori differenti del rapporto massa/carica: ciò si realizza variando con continuità H oppure V. Il collettore è connesso ad un apparato elettronico di misura che comanda a sua volta un registratore grafico. Lo schema di uno spettrometro di massa è rappresentato in Fig. 25.
Tale apparecchio ha molti impieghi di cui il più comune è la determinazione delle masse atomiche. Esso può anche servire per compiere analisi chimiche di prodotti organici. Infatti molecole complesse che possiedono proprietà chimiche molto simili e che quindi possono essere separate assai difficilmente per via chimica (ad esempio idrocarburi di peso molecolare molto elevato) possono invece essere separati facilmente per mezzo di tale strumento. Altre applicazioni dello spettrometro di massa sono la separazione e la determinazione delle masse degli isotopi degli elementi, la ricerca di perdite in apparecchiature da vuoto, lo studio del decorso di alcuni importanti processi chimici.

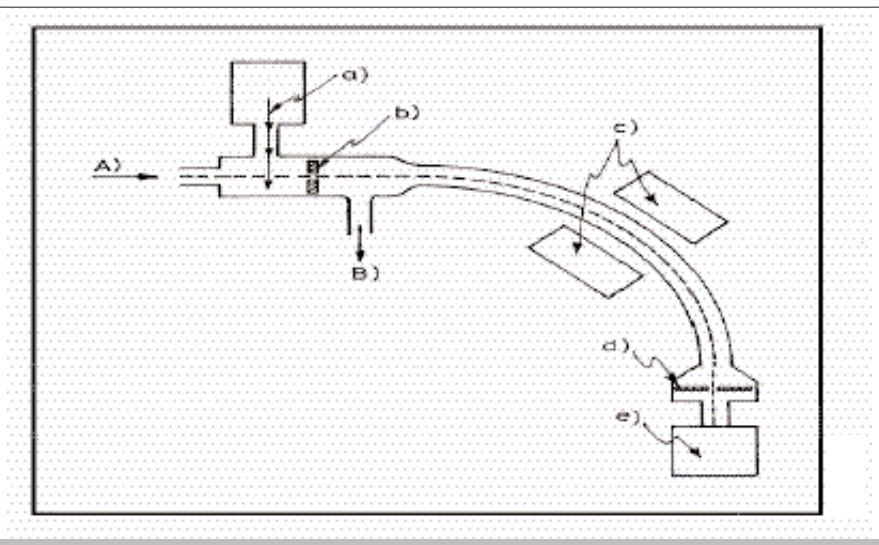


Figura 25: Schema di spettrometro di massa. A= Punto di immissione del campione; a = bombardamento di elettroni; b = elettrodi acceleranti (potenziale negativo); B = uscita per il vuoto; c = magnete; d = fenditura; e = collettore di ioni.

1030. Metodi di campionamento

Il campionamento può definirsi come l'operazione di prelevamento della parte di una sostanza di dimensione tale che la proprietà misurata nel campione prelevato rappresenti, entro un limite accettabile noto, la stessa proprietà nella massa di origine. In altre parole, il fine ultimo del campionamento ambientale è sempre quello di consentire la raccolta di porzioni rappresentative della matrice che si vuole sottoporre ad analisi. Il campionamento costituisce quindi la prima fase di ogni processo analitico che porterà a risultati la cui qualità è strettamente correlata a quella del campione prelevato. Per tale motivo, il campionamento è una fase estremamente complessa e delicata che condiziona i risultati di tutte le operazioni successive e che di conseguenza incide in misura non trascurabile sull'incertezza totale del risultato dell'analisi.
Gli studi disponibili mettono in evidenza che l'incertezza associata al campionamento può contribuire anche per il 30-50% all'incertezza associata al risultato analitico finale ed è di gran lunga più elevata rispetto all'incertezza associata alla fase analitica (circa il 5%).
Numerose fonti di incertezza possono influire sui risultati di analisi ambientali. La Tab. 1 riassume in modo schematico le principali fasi di un'analisi ambientale, le possibili fonti di incertezza ed un indice qualitativo per valutare quanto la specifica fase possa gravare sull'incertezza finale.

Tabella 1: Fasi dell'analisi ambientale, possibili fonti di incertezza e indice qualitativo per valutare quanto la procedura eseguita possa gravare nella valutazione dell'incertezza finale di una misura analitica

Fase	Sorgente di incertezza	Indice qualitativo di incertezza
Pianificazione		
Definizione dell'area	Variabilità spaziale, eterogeneità	Alto
Metodo di campionamento	Rappresentatività statistica, contaminazione o perdite	Alto, parzialmente controllabile
Numero dei campioni	Rappresentatività statistica	Alto
Massa del campione	Rappresentatività statistica	Basso
Tempistica	Variabilità temporale	Alto
Campionamento		
Condizioni ambientali	Irriproducibilità	Molto alto
Imballaggio del campione	Contaminazione o perdite	Controllabile
Conservazione del campione	Perdite per metabolismo, volatilizzazione ecc. (in particolare relativamente a campioni di acqua, aria e tessuti animali)	Medio
Trasporto	Contaminazione e perdite per metabolismo, volatilizzazione (in particolare per i campioni di suolo e acqua)	Alto
Immagazzinamento Breve termine/Lungo termine	Contaminazione o perdite, metabolismo, alterazione della forma e del peso originari, speciazione, solubilità	Alto
Preparazione del campione		
Pulizia, lavaggio	Contaminazione o perdite per lisciviazione	Alto
Essiccazione	Perdite, contaminazione	Medio
Omogeneizzazione	Contaminazione	Alto
Sottocampionamento	Eterogeneità, distribuzione delle particelle e dell'analita	Medio
Pretrattamento	Contaminazione a causa dei reagenti o del contenitore del campione, precipitazione, perdite per adsorbimento	Controllabile

segue

segue

Fase	Sorgente di incertezza	Indice qualitativo di incertezza
Analisi	Strumenti settati in maniera errata, interferenze fisiche e chimiche nella fase di taratura	Medio - Basso
Valutazione dei dati	Noncuranza delle distribuzioni asimmetriche, della naturale variabilità	Medio - Alto

2. Il piano di campionamento

La predisposizione del piano di campionamento, finalizzato alla raccolta di una serie di campioni rappresentativi risulta fondamentale per una corretta descrizione del fenomeno investigato.
La definizione degli obiettivi del campionamento (ricerca, monitoraggio, controllo, ecc.) è una fase cruciale di tutto il processo analitico, in quanto rappresenta un fattore condizionante l'intero approccio sperimentale che comprende la scelta del numero e della localizzazione dei punti di campionamento, la determinazione della frequenza, della durata e delle procedure di prelievo, nonché il successivo trattamento dei campioni e la scelta delle più adeguate metodiche analitiche da utilizzare.
La predisposizione di un piano di campionamento, che conduca ad una serie di campioni rappresentativi del fenomeno da descrivere, implica oltre ad una conoscenza preliminare del sistema da analizzare, una chiara definizione degli obiettivi da perseguire.
L'analisi può essere finalizzata alla verifica del rispetto di limiti, alla definizione della variabilità spaziale e/o temporale di uno o più parametri, al controllo di scarichi accidentali od occasionali, alla determinazione di parametri di processo, alla caratterizzazione fisica, chimica o biologica di un ambiente.
Dal punto di vista analitico, la rappresentatività del risultato dipende dal numero di campioni prelevati. Tale numero può essere definito statisticamente in base a criteri dipendenti dagli obiettivi di qualità e dalla ripetibilità del metodo. Generalmente, però, il numero di campioni ricavati in base a considerazioni statistiche è poco realistico, perché porta spesso ad un numero di prelievi non sostenibile rispetto alle risorse economiche, umane e laboratoristiche disponibili. Il calcolo statistico è basato, inoltre, su alcune assunzioni che non sempre possono essere accettate a priori (in particolare in campo ambientale), come quella della normalità della distribuzione dei valori misurati. Dal punto di vista pratico, il numero di repliche può rappresentare un giusto compromesso tra le esigenze della rappresentatività analitica e le risorse disponibili.
Il campione dovrà inoltre essere:

- prelevato in maniera tale che mantenga inalterate le proprie caratteristiche fisiche, chimiche e biologiche fino al momento dell'analisi;
- conservato in modo tale da evitare modificazioni dei suoi componenti e delle caratteristiche da valutare.

Fissati gli obiettivi del prelievo, le operazioni di campionamento devono essere effettuate sulla base di uno specifico "Piano di campionamento", che deve programmare nel dettaglio le operazioni di campionamento secondo criteri e disposizioni che in alcuni casi sono stabilite da normative tecniche di riferimento. Il campionamento, essendo parte integrante dell'intero procedimento analitico, deve essere effettuato da personale qualificato e nel rispetto della normativa in materia di sicurezza del lavoro.

Un piano di campionamento deve quindi prevedere:

- la definizione dell'obiettivo;
- la descrizione del sito di campionamento;
- la strategia di campionamento;

- l'indicazione delle matrici da campionare;
- le metodiche di campionamento;
- la numerosità dei campioni;
- la durata del campionamento;
- la frequenza del campionamento;
- il numero di addetti e delle loro competenze necessarie per la conduzione del campionamento;
- la pianificazione logistica del campionamento (mezzi di trasporto, luoghi di accesso, ecc.);
- le modalità di trasporto dei campioni;
- la conservazione dei campioni;
- il controllo di qualità;
- la pianificazione della sicurezza sul lavoro;
- la definizione del tipo di documentazione che deve essere utilizzato durante tutto il programma di campionamento.

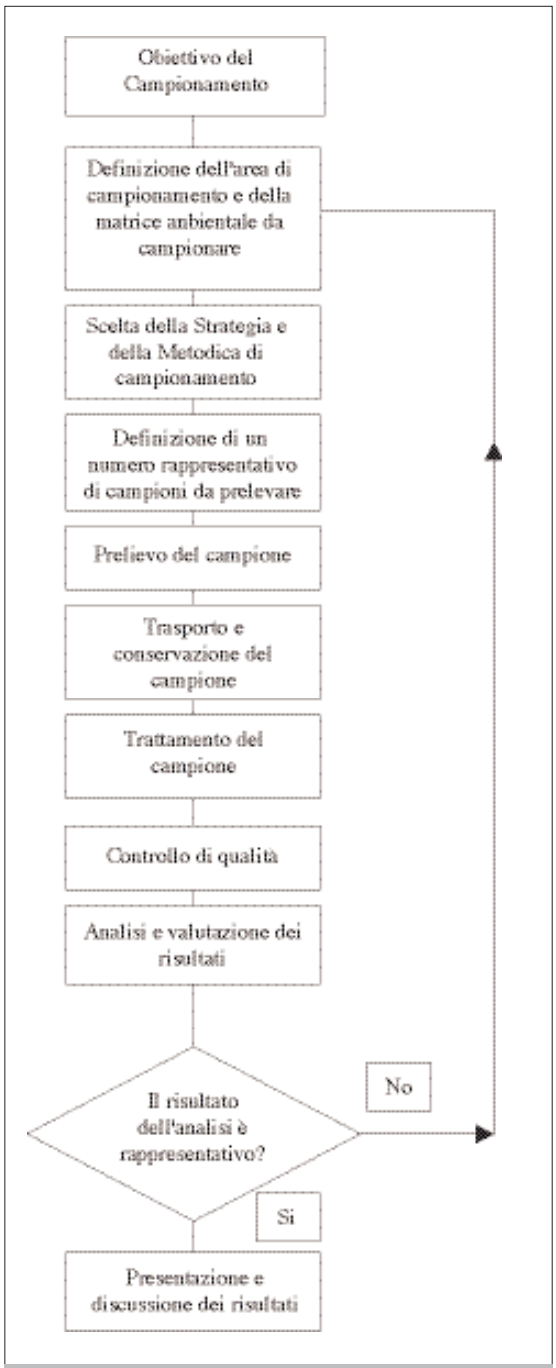


Figura 1: Diagramma di flusso del campionamento e analisi ambientale.

La documentazione del campione prelevato dovrà altresì includere lo scopo del campionamento, la descrizione del luogo del prelievo, l'ora ed il giorno del prelievo, le caratteristiche del campione, le precauzioni necessarie alla conservazione, l'identificazione del campione, l'identificazione degli operatori e delle analisi che devono essere fatte. La quantità da prelevare dal campione per le analisi dipende dalla tecnica analitica e dai limiti di sensibilità richiesti.
Il piano di campionamento è strutturato quindi secondo una sequenza molto articolata di operazioni, rappresentata in maniera sintetica tramite il diagramma di flusso di Fig. 1. Mutare "in corso d'opera" la strategia del piano di campionamento, in assenza anche di una qualsiasi registrazione delle modifiche apportate, può avere conseguenze che possono inficiare profondamente la confrontabilità dei risultati.
Spesso trascurate, le variabili climatiche, idrologiche, morfometriche ecc., assumono in certi casi un'importanza chiave nella interpretazione dei risultati. Un caso particolare di variabile strettamente legata alla fase di prelievo è la definizione esatta della posizione geografica del punto di raccolta dei campioni. Sia nel caso di fiumi, ma ancor più nel campionamento di laghi o acque sotterranee, è indispensabile registrare su carte geografiche di scala appropriata (1:10.000 o 1:25.000) le coordinate del luogo di prelievo. Questa operazione una volta complessa oggigiorno viene

effettuata in modo semplice mediante strumenti di posizionamento satellitare (Global Position System, GPS) alla portata di chiunque. Anche la corretta misura della profondità del punto di prelievo rappresenta una variabile di campo significativa per interpretazioni successive della validità e/o rappresentatività del campionamento.
Oltre a quelle prima indicate, oggi sono ormai facilmente ottenibili anche misure dirette in campo di variabili ambientali (conducibilità, pH, ossigeno, temperatura, clorofilla, ecc.), che sono utili per orientare e migliorare le operazioni di prelievo. L'utilità maggiore dei sistemi di misura in tempo reale è comunque costituita dalla possibilità di acquisire un numero elevato di misure in tempi molto brevi rispetto ai sistemi tradizionali. In un ambiente fluviale è ad esempio possibile effettuare transetti tra le rive che in pochi minuti forniscono centinaia di misure. In questi casi si è in grado di individuare facilmente la presenza di un "plume" dovuto alla non completa miscelazione di due masse d'acqua, che possono differire per contenuto termico, per i soluti o per gli inquinanti trasportati, orientando quindi le modalità di prelievo. In un ambiente lacustre si possono invece condurre profili verticali mediante sonde multiparametriche che permettono di ottenere misure ad intervalli di frazioni di metro, che sono di grande utilità per identificare le diverse stratificazioni (termiche e chimiche) presenti. Nel caso di acque sotterranee, infine, l'uso di metodi di misura in tempo reale è raccomandato per il controllo delle operazioni di spurgo dei piezometri di prelievo dei campioni, per identificare eventuali traccianti salini utilizzati per verificare i movimenti delle acque di falda, ecc.
Le strategie di campionamento possono essere:

- casuali;
- stratificate;
- sistematiche;
- preferenziali o ragionate.

Per campionamento *"casuale"* (random) si intende un prelevamento senza "bias", cioè senza derive tendenziose, ma non "a casaccio". I singoli prelevamenti dovrebbero avere la stessa probabilità d'includere tutti i componenti delle soluzioni in esame. Questa tecnica si utilizza con soluzioni omogenee, per la misura di alcune proprietà fisiche e chimiche e quando non si abbiano sufficienti informazioni.
Nel campionamento *"stratificato"* l'intera area in esame è suddivisa in sottoaree, da ciascuna delle quali è tratto un campionamento sistematico o casuale semplice. Si ricorre ad un tale procedimento qualora si voglia effettuare un'inferenza statistica su ciascuna sottoarea separatamente.
Il campionamento *"sistematico"* è la tecnica più comune e consiste nel prelevamento del campione ad intervalli (di tempo o di spazio) predeterminati nel piano di campionamento. Rispetto al campionamento casuale, il campionamento sistematico permette una distribuzione maggiormente uniforme dei punti di campionamento e in generale, rappresenta il miglior schema per l'applicazione della geostatistica.
Il campionamento *"preferenziale* o *ragionato"* è quello che, attraverso esperienze dirette visive in campo o in base ad esperienze del passato, conoscenza dei luoghi, esperienza dell'operatore, condizioni fisiche locali ed informazioni raccolte permette di definire in modo appunto "ragionato" i siti di prelievo.
Ci sono poi combinazioni tra le strategie sopra elencate, del tipo: casuale preferenziale, casuale stratificato, sistematico stratificato, sistematico casuale e sistematico preferenziale.
La scelta della strategia dipende anche dall'utilizzazione prevista dei dati: i campioni per scopi legali dovrebbero essere preferibilmente casuali ed avere una elevata numerosità; i campioni per studi di ricerca possono essere più efficaci e rappresentativi se prelevati mediante un tipo di campionamento preferenziale o sistematico. Spesso una combinazione dei diversi tipi è l'approccio migliore.
Per campionamento *"istantaneo"* si intende il prelievo di un singolo campione in un'unica soluzione in un punto determinato ed in un tempo molto breve. Il campionamento istantaneo è da considerarsi rappresentativo delle condizioni presenti all'atto del prelievo ed è consigliabile per controllare scarichi accidentali e/o occasionali di brevissima durata. Si può utilizzare tale tipo di campionamento anche per altri tipi di scarico e per le seguenti finalità:

- controlli estemporanei derivanti da necessità contingenti o per determinare effetti istantanei sull'ambiente ricettore;
- controllo delle escursioni dei valori di parametri in esame nel caso di scarichi a composizione variabile;
- controllo di parametri particolari, quali temperatura, ossigeno disciolto, pH, solfuri, cianuri liberi e altri, i valori dei quali possono essere modificati nel corso di un campionamento prolungato.

Il campionamento *"medio"* consiste nell'ottenere un campione effettuando prelievi in un dato intervallo di tempo (ad esempio ogni 3, 6, 12, 24 ore) in maniera continua o discontinua, proporzionale o non alla portata dell'effluente. La scelta della durata del campionamento, del numero dei prelievi e della loro frequenza sarà stabilita in funzione della variabilità delle caratteristiche quali-quantitative dell'effluente. Si distingue in:

- campionamento *"medio-composito"*. Viene realizzato mescolando un numero di campioni istantanei prelevati ad opportuni intervalli di tempo, in modo proporzionale o non alla portata;
- campionamento *"medio-continuo"*. Viene effettuato prelevando in maniera continua e per un dato intervallo di tempo, una porzione dell'effluente, proporzionale o non alla portata del medesimo.

Il D.Lgs. 152/99 richiede il prelievo di campioni medi per il controllo dei limiti per le acque reflue urbane (campioni medi ponderati nell'arco delle 24 ore) e per le acque reflue industriali (campioni medi prelevati nell'arco di tre ore).

3. La scelta delle apparecchiature per il campionamento

È importante tenere presente che nell'ambiente acquatico in generale i contaminanti tendono a distribuirsi tra la componente liquida e la componente solida sospesa (materiale in sospensione). Per convenzione, il materiale in sospensione è definito come il materiale solido che è trattenuto da filtri con porosità di 0,45 μm, mentre il materiale disciolto è quello che passa attraverso la membrana filtrante. La distribuzione tra la fase liquida e la fase solida sospesa è fortemente dipendente:

- dal tipo di contaminante;
- dalle caratteristiche chimico-fisiche delle acque e dalle proprietà superficiali del particolato;
- dalle caratteristiche idrologiche delle acque in esame;
- dal tempo intercorso tra l'immissione del contaminante nelle acque ed il campionamento e/o la determinazione del contaminante stesso.

Particolare cura dovrà essere prestata nella scelta del metodo di campionamento al fine di eliminare o ridurre al minimo qualsiasi fonte di contaminazione da parte delle apparecchiature di campionamento. La contaminazione del campione da parte delle apparecchiature di campionamento può rappresentare una rilevante fonte di incertezza da associare al risultato analitico. Deve essere quindi valutata la capacità di assorbire o rilasciare analiti da parte delle diverse componenti del sistema di campionamento (tubi, componenti in plastica o in metallo, ecc.).
Un ulteriore fattore che può condizionare la qualità di una misura di un campione ambientale, è rappresentato dal fenomeno di "cross-contamination". Con tale termine si intende il potenziale trasferimento di parte del materiale prelevato da un punto di campionamento ad un altro, nel caso in cui non venga accuratamente pulita l'apparecchiatura di campionamento tra un prelievo ed il successivo. È fondamentale pertanto introdurre nell'ambito del processo di campionamento una accurata procedura di decontaminazione delle apparecchiature.

4. Sistemi di campionamento

I sistemi di campionamento attualmente disponibili possono essere raggruppati in due principali categorie:

- sistemi per la raccolta di piccoli volumi di acque;
- sistemi per la raccolta e filtrazione "in situ" di grossi volumi di acqua (20÷2000 litri), funzionali ad indagini sul particolato.

4.1 Campionamento di piccoli volumi di acque

Questi sistemi permettono di raccogliere diverse aliquote di campioni in uno o più contenitori da sottoporre successivamente a filtrazioni ed analisi. Sono sistemi di semplice utilizzo e manutenzione anche da parte di operatori non specializzati.
Il prelievo del campione di acqua può essere effettuato con sistemi di campionamento costituiti da bottiglie verticali (bottiglia di Niskin) o orizzontali (Van Dorn) o tramite un campionatore automatico.

A. Le bottiglie Niskin e Van Dorn sono costituite da cilindri di materiale plastico le cui estremità sono aperte nella fase iniziale del campionamento e che possono essere chiuse alla profondità prestabilita del corpo idrico in esame, tramite l'invio di un messaggero. Il messaggero attiva un meccanismo che permette la chiusura di entrambe le estremità delle bottiglie. La capacità delle bottiglie è molto variabile: in genere i volumi prelevabili variano da 1 dm^3 fino a 30 dm^3. Questi sistemi forniscono un campione istantaneo e non prelievi integrati nel tempo e sono quindi rappresentativi solo della qualità dell'acqua al momento e nel sito puntuale in cui il campione di acqua è prelevato. Generalmente utilizzando questi sistemi di campionamento intercorre un certo periodo tra il campionamento e la successiva filtrazione del campione in laboratorio. Durante questo periodo la frazione più pesante del particolato in sospensione (particelle di dimensioni maggiori) può depositarsi sul fondo della bottiglia. Al fine di assicurare un campione omogeneo e rappresentativo delle acque in esame, particolari cautele dovranno essere prese in questo caso per non perdere la frazione più pesante del particolato in sospensione, sia durante l'apertura delle estremità delle bottiglie, sia nel caso in cui si voglia filtrare solo un'aliquota del campione raccolto con la bottiglia.
Nel caso in cui la componente solida sospesa non sia distribuita uniformemente nella colonna d'acqua, il campione raccolto con questi sistemi va riferito allo strato di colonna interessato dal campionamento e non a tutta la massa d'acqua. Campionatori del tipo a "bottiglia orizzontale" sono da preferire a campionatori verticali, nel caso in cui si vogliano caratterizzare forti gradienti verticali di variabili ambientali nella colonna d'acqua.

B. Il campionatore automatico permette il prelievo contemporaneo di più campioni di acqua e particolato a diverse profondità e/o in diverse posizioni. Questo sistema, a differenza di quanto avviene per le bottiglie Niskin o Van Dorn, permette di effettuare anche prelievi integrati in un periodo temporale abbastanza lungo. Esistono due tipi principali di campionatori automatici, uno dipendente dal tempo e l'altro dal volume. I campionatori dipendenti dal tempo prelevano campioni discreti, compositi e continui, ma ignorano le variazioni di flusso del corpo idrico in esame, mentre i campionatori dipendenti dal volume prelevano campioni discreti, compositi o continui, ma in modo dipendente dalle variazioni di flusso. La scelta dipende dall'obiettivo dell'indagine. I campionatori automatici richiedono un'alimentazione elettrica che può essere fornita da batterie ricaricaribili o da un motogeneratore.

Se l'indagine richiede la separazione della frazione solida sospesa dalla componente liquida, i campioni di acqua raccolti con tutti i sistemi sopra descritti devono essere filtrati il più presto possibile dopo il campionamento. La filtrazione di un volume noto del campione di acqua è normalmente effettuata a temperatura ambiente, utilizzando filtri compatibili con il campione di acqua in esame.

In questi sistemi di campionamento, in genere si opera con prelievi sistematici di tipo istantaneo (*grab samples*), mentre, nel caso siano evidenti forti variazioni nel tempo o comunque sia necessario definire con maggiore certezza un valore medio che caratterizzi una variabile dell'ambiente acquatico in esame, si possono utilizzare campioni ottenuti per miscelazione di aliquote raccolte ad intervalli di tempo prestabiliti (*composite samples*). In casi particolari, come ad esempio gli ambienti lacustri, l'integrazione temporale viene sostituita da quella spaziale (*integrated samples*), raccogliendo aliquote di campione rappresentative di un'intera colonna o di una superficie acquatica. Tale operazione, che può essere effettuata sia in modo manuale discontinuo che in modo automatico continuo, permette di rappresentare una variabile con un valore integrato non dipendente direttamente dall'operatore. L'uso di campioni integrati, sebbene consenta solo valutazioni complessive, basate su medie temporali giornaliere, settimanali o mensili, sui meccanismi che governano il trasporto e la diffusione degli inquinanti, ha comunque il grande vantaggio di produrre un numero ridotto di campioni.

4.2 Campionamento e filtrazione "in situ" di grossi volumi di acque

Questi sistemi sono particolarmente indicati nel caso in cui sia necessario dover filtrare grossi volumi di acque (20÷2000 litri) per il recupero di materiale particolato e si dividono in tre principali categorie:

- filtrazione a flusso perpendicolare;
- filtrazione a flusso tangenziale;
- centrifugazione.

I campioni prelevati con questi sistemi contengono tutti i costituenti presenti nelle acque durante il periodo di campionamento considerato, ma non forniscono informazioni sulle variazioni di concentrazione della frazione solida sospesa, di concentrazione dei contaminanti associati alla frazione solida sospesa e di concentrazione dei contaminanti associati alla componente disciolta, avvenute durante il periodo di campionamento.

A. I sistemi di filtrazione a flusso perpendicolare permettono la filtrazione di grandi volumi di acque (50÷2000 litri) in tempi relativamente brevi (100-200 litri/ora), utilizzando generalmente filtri a cartuccia (con estese superfici filtranti) e con porosità di 0,45 μm. Sono particolarmente indicati per la raccolta di contaminanti associati alla frazione solida sospesa.

B. I sistemi di filtrazione a flusso tangenziale possono permettere la filtrazione di grandi volumi di acque (50÷700 litri) ed in questo caso la frazione solida è raccolta, a filtrazione ultimata, concentrata in un ridotto volume di acqua, senza essere associata a nessun supporto filtrante.

C. I sistemi di prelievo per centrifugazione consentono di trattare minori quantità di acque (50÷200 litri) ed offrono generalmente gli stessi vantaggi dei sistemi di filtrazione a flusso tangenziale.

5. Conservazione del campione

Conservare un campione significa garantire la stabilità e la inalterabilità di tutti i suoi costituenti nell'intervallo di tempo che intercorre tra il prelievo e l'analisi. Questi aspetti non sono realizzabili al cento per cento; è però possibile ricorrere ad accorgimenti al fine di ridurre al minimo le alterazioni, salvaguardando la rappresentatività del campione. Un campione ambientale, nel momento stesso in cui viene separato e confinato in un recipiente non rappresenta più, a stretto rigore, il sistema di origine. Da quel momento il campione inizia a modificarsi fisicamente (evaporazione, sedimentazione, adsorbimento alle pareti del contenitore ecc.), chimicamente (reazioni di neutralizzazione, trasformazioni ossidative ecc.) e biologicamente (attacco batterico, fotosintesi ecc.).

Vari fattori di tipo meccanico concorrono inoltre all'alterazione della composizione del campione. Tra questi si ricordano l'imperfetta chiusura del contenitore ed il deposito o rilascio di sostanze sulle o dalle pareti del contenitore.
Per ovviare a questi inconvenienti e per ridurre entro limiti accettabili le variazioni delle caratteristiche del campione è necessario utilizzare contenitori costituiti da materiali scelti di volta in volta, in funzione del parametro da determinare.
La precipitazione dei metalli come idrossidi, l'adsorbimento dei metalli sulle superfici del contenitore, la formazione di complessi, la variazione dello stato di valenza di alcuni elementi, possono essere ritardati mediante l'addizione di stabilizzanti chimici e/o una idonea conservazione.
L'attività microbica, a cui è imputabile l'alterazione di alcuni parametri analitici (ad esempio COD, fosforo e azoto organici), può essere convenientemente ritardata mediante l'aggiunta di battericidi e/o ricorrendo alla refrigerazione.
Le Tabb. 2 e 3 riportano alcune raccomandazioni per quanto riguarda i contenitori, i principali conservanti e i procedimenti più adatti per la migliore conservazione del campione dal momento del prelievo a quello dell'analisi. Le suddette tabelle fanno riferimento alle acque di scarico.
Per quanto attiene i tempi massimi intercorrenti tra il prelievo e l'analisi, indipendentemente dalle indicazioni riportate nelle suddette tabelle, è raccomandabile eseguire sempre le analisi sui campioni, il più presto possibile dopo la raccolta. Al fine di avere maggiori garanzie di stabilità del campione è opportuno, in tutti quei casi in cui l'analisi andrà effettuata sul campione filtrato, eseguire la filtrazione entro le 24 ore e conservare il campione filtrato secondo le modalità indicate nelle suddette tabelle.
Per attività non finalizzate al controllo si può ricorrere, dopo filtrazione del campione, ad una stabilizzazione per congelamento. Questo tipo di stabilizzazione consente l'effettuazione delle analisi anche dopo diverse settimane dal campionamento per la stragrande maggioranza degli analiti.

5.1 Recipienti per la raccolta e il trasporto dei campioni

I contenitori utilizzati per la raccolta e il trasporto dei campioni non devono alterare il valore di quei parametri di cui deve essere effettuata la determinazione, in particolare:

- non devono cedere o adsorbire sostanze, alterando la composizione del campione;
- devono essere resistenti ai vari costituenti presenti nel campione;
- devono garantire la perfetta tenuta, anche per i gas disciolti e per i composti volatili, ove questi siano oggetto di determinazioni analitiche.

I materiali più usati per i contenitori sono generalmente il vetro, la plastica e altri materiali. Riguardo al vetro, che rimane il materiale da preferire, esistono in commercio diverse qualità che si differenziano per la composizione e per la resistenza agli agenti fisici e chimici. Tra questi i più indicati sono il vetro Pyrex (boro-silicato) e il Vycor (ad alto contenuto di silicio) che è di qualità migliore ma ha costi più elevati.
Nel caso in cui non sia richiesta una particolare impermeabilità ai gas o nel caso in cui non vi siano interferenze dovute agli additivi organici (per esempio, plastificanti), si può ricorrere all'uso di materiale plastico che presenta il vantaggio di essere leggero, resistente all'urto ed economico. In questi casi, il polietilene* presenta il vantaggio di essere più resistente agli agenti chimici ed alle variazioni termiche e presenta inoltre una buona resistenza all'urto.
Sono anche segnalati contenitori costituiti da altro materiale polimerico come il policarbonato (soprattutto per campioni contenenti metalli), il teflon, il cloruro di polivinile e il polimetilpentene (TPX).

* Il polietilene e il TPX sono, tra i materiali plastici impiegati, quelli che mediamente cedono meno impurezze e pertanto sono consigliabili quando è necessario determinare concentrazioni dell'ordine di 10^{-9} parti (m/m o m/v).

Tabella 2: Raccomandazioni per la conservazione di campioni acquosi tra il campionamento e l'analisi (composti inorganici)

Composto	Tipo di contenitore	Conservazione	Tempo massimo di conservazione
Acidità e alcalinità	Polietilene, vetro	Refrigerazione *	24 ore
Anidride carbonica	Polietilene, vetro		Analisi immediata
Azoto ammoniacale	Polietilene, vetro	Refrigerazione	24 ore
Azoto nitrico	Polietilene, vetro	Refrigerazione	48 ore
Azoto nitroso	Polietilene, vetro	Refrigerazione	Analisi prima possibile
Azoto totale	Polietilene, vetro	Refrigerazione	24 ore
Boro	Polietilene	Refrigerazione	1 settimana
Calcio	Polietilene, vetro	Refrigerazione	24 ore
Cianuri (totali)	Polietilene, vetro	Aggiunta di NaOH fino a pH>12, refrigerazione al buio	24 ore
Cloro	Polietilene, vetro	-	Analisi immediata
Cloruro	Polietilene, vetro	Refrigerazione	1 settimana
Conducibilità	Polietilene, vetro	- Refrigerazione	Analisi immediata 24 ore
Durezza	Polietilene, vetro	Refrigerazione	24 ore
Fluoruro	Polietilene	Refrigerazione	1 settimana
Fosfato inorganico	Polietilene, vetro	Refrigerazione	24 ore
Fosforo totale	Polietilene, vetro	Aggiunta di H_2SO_4 fino a pH< 2 e refrigerazione	1 mese
Metalli disciolti	Polietilene, vetro	Filtrazione su filtri da 0,45 µm; aggiunta di HNO_3 fino a pH<2	1 mese
Metalli totali**	Polietilene, vetro	Aggiunta di HNO_3 fino a pH<2	1 mese
Cromo (VI)	Polietilene, vetro	Refrigerazione	24 ore
Mercurio	Polietilene, vetro	Aggiunta di HNO_3 fino a pH<2, refrigerazione	1 mese
Ossigeno disciolto (elettrodo)			Misura "in situ", analisi immediata
Ossigeno disciolto (metodo di Winkler)	Vetro	Aggiunta di reattivi di Winkler sul posto	24 ore
pH	Polietilene, vetro	- Refrigerazione	Analisi immediata 6 ore
Potassio	Polietilene	Refrigerazione	1 settimana
Silice	Polietilene	Refrigerazione	1 settimana
Sodio	Polietilene	Refrigerazione	1 settimana
Solfato	Polietilene, vetro	Refrigerazione	1 mese
Solfito	Polietilene	Refrigerazione	24 ore
Solfuro	Polietilene, vetro	Refrigerazione, aggiunta di acetato di zinco; aggiunta di NaOH fino a pH>9	1 settimana
Torbidità	Polietilene, vetro	Refrigerazione al buio	24 ore

** Per refrigerazione si intende la conservazione del campione in frigorifero con controllo della temperatura.*

*** Per metallo totale si intende la somma del metallo disciolto e del metallo estraibile con acido nelle condizioni indicate*

Esistono infine contenitori in metallo, per esempio acciaio inox, usati per alcuni campionamenti particolari, ma il loro impiego non è molto diffuso.

Tabella 3: Raccomandazioni per la conservazione di campioni acquosi tra il campionamento e l'analisi (composti organici)

Composto	Tipo di contenitore	Conservazione	Tempo massimo di conservazione
Aldeidi	Vetro scuro	Refrigerazione*	24 ore
BOD	Polietilene, vetro	Refrigerazione	24 ore
COD	Polietilene, vetro	Refrigerazione. Aggiunta di H_2SO_4 fino a pH< 2	Analisi immediata 1 settimana
Composti fenolici	Vetro	Refrigerazione, aggiunta di H_2SO_4 fino a pH< 2	1 mese
Idrocarburi policiclici aromatici (PAH)	Vetro scuro	Refrigerazione	48 ore 40 giorni dopo l'estrazione
Oli e grassi		Aggiunta di HCl fino a pH< 2	1 mese
Pesticidi organoclorurati	Vetro	Refrigerazione, aggiunta del solvente estraente	7 giorni
Pesticidi organofosforati	Vetro	Refrigerazione, aggiunta del solvente estraente	24 ore
Policlorobifenili (PCB)	Vetro	Refrigerazione	7 giorni prima dell'estrazione; 40 giorni dopo l'estrazione
Solventi clorurati	Vetro	Refrigerazione, riempimento contenitore fino all'orlo	48 ore
Solventi organici aromatici	Vetro	Refrigerazione, riempimento contenitore fino all'orlo	48 ore
Tensioattivi	Polietilene, vetro	Refrigerazione Aggiunta di 1% (v/v) di formaldeide al 37%	24 ore 1 mese

** Per refrigerazione si intende la conservazione del campione in frigorifero con controllo della temperatura.*

In linea generale il volume del campione dipende dalle determinazioni da eseguire e dal metodo di analisi impiegato. Si consiglia di prelevare in ogni caso quantità di campione in eccesso e di distribuirlo in più contenitori, in modo da premunirsi dalla possibilità di perdita del campione per eventuali incidenti ed avere la possibilità di compiere ulteriori accertamenti, se ritenuti in seguito necessari. Tale aspetto è fondamentale, ad esempio, nel settore delle analisi forensi. Qualora si renda necessario evitare il contatto del campione con l'aria o si debbano analizzare sostanze volatili, si consiglia di riempire il contenitore fino all'orlo. In quest'ultimo caso tale accortezza impedisce il trasferimento degli analiti nello spazio di testa e la loro perdita all'atto dell'apertura dei contenitori.

BIBLIOGRAFIA

ANPA (1999): "*Le principali metodiche di campionamento ed analisi del particellato in sospensione in ambienti acquatici*", Rassegna bibliografica, Serie Documenti 9/1999, ISBN 88-448-0019-5, 140p.

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods far the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed. (Washington, APHA).

BARBIZZI S., de ZORZI P., GALAS C. (2002): *"Metrologia e conduzione del campionamento ambientale"*, *Tutto Misure*, Augusta-Edizioni Mortarino, n. 01, anno IV.

BAUDO R. (1990): "Sediment sampling, mapping, and data analysis", in R. Baudo, J. Giesy and H. Muntau (Eds), *Sediments: Chemistry and toxicity of in-place pollutants*, Lewis Publisher, Inc., Chelsea, Michigan, 15-60.

BENOLIEL M.J. (1994): "Sample storage for inorganic compounds in surface waters – a review", *Inter. J. Environ. Anal. Chem.*, **57**, 197-206.

BENOLIEL M.J. (1994): "Preservation techniques for analysis of organic compounds in water samples – a review", *Inter. J. Environ. Anal. Chem.*, **57**, 231-236.

CANTER L.W., KNOX R.C. & FAIRCHILD D.M. (1987): "*Ground water quality protection*, Lewis Publisher, Inc., Chelsea, Michigan, 562 pp.

EURACHEM/CITAC Guide (2000): "*Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*", Laboratory of Government Chemist, London, April.

GALAS C., SANSONE U. & BELLI M. (2002): "*Intercomparison of freshwater and suspended particles sampling methodologies used in environmental radioactivity monitoring*", Final Report 1999-2001, European Commission Contract n° 99/70549, ISBN 88-448-0045-4, ANPA, Serie Rapporti 13/2002, 113p.

ISO 5667-4 (1987): " *Guidance on sampling from lakes, natural and man made*".

KIETH L.H. (1996): "*Principles of Environmental Sampling*", ASC Professional Reference, American Chemical Society, Washington DC.

KRAICA J.M. (1989): "*Water sampling*", J. Wiley and Sons, New York, 212 pp.

MYERS J.C. (1997): "*Geostatistical Error Management – Quantifying Uncertainty for Environmental Sampling and Mapping*", International Thomson Publishing Company, USA.

RAMSEY M.H. (1998): "Sampling as a source of measurement uncertainty: techniques for quantification and comparison with analytical sources", *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **13**, 97-104.

SANSONE U., BELLI M., RICCARDI M., ALONZI A., JERAN Z., RADOJCO J., SMODIS B., MONTANARI M. & CAVOLO F. (1998): "Adhesion of water-borne particulates on freshwater biota", *Sci.Total Environ.*, **219**, 21-28.

UNI EN 25667-1 (1996): "*Guida alla definizione di programmi di campionamento*", Milano.

UNI EN 25667-2 (1996): "*Qualità dell'acqua Campionamento*", Guida alla definizione di programmi di campionamento.

UNI EN ISO 5667-3 (1998): "*Qualità dell'acqua Campionamento*", Guida per la conservazione ed il maneggiamento di campioni.

WAGNER G. (1995): "Basic approaches and methods for quality assurance and quality control in sample collection and storage for environmental monitoring", *Sci. Total Environ.* **176**, 63-71.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (1982): *"Design of sampling systems"*, Manual on Analysis for Water Pollution Control, Ginevra.

1040. Qualità del dato analitico

Introduzione

Questo capitolo riguarda una scelta di informazione essenziale sulla valutazione dell'incertezza di misura nonché il trattamento dei dati sperimentali. Il capitolo si basa su quanto riportato nelle pubblicazioni UNI CEI EN ISO/IEC 17025, UNI CEI ENV 13005 e EURACHEM/CITAC Guide "Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement".

1. Errore

Tradizionalmente, un errore è costituito da due componenti, una casuale o aleatoria ed una sistematica.

1.1 Errori sistematici

La caratteristica degli errori sistematici è di influire in genere sempre nello stesso senso e nella stessa misura nelle successive ripetizioni dell'osservazione. Tali errori non possono essere eliminati ma il loro effetto può essere ridotto. Se una grandezza che influenza il risultato di una misurazione produce un effetto identificato come errore sistematico, tale effetto può essere quantificato e compensato, se di proporzioni significative rispetto all'accuratezza richiesta alla misurazione, apportando una correzione. Ovviamente, una volta effettuata la correzione il valore atteso dell'errore generato da un effetto sistematico si ipotizza uguale a zero.

1.2 Errori casuali

Gli errori casuali o accidentali sono originati da variazioni non prevedibili o casuali, nel tempo e nello spazio, delle grandezze che influenzano il risultato della misurazione. Per quanto l'operatore si sforzi di eseguire la determinazione con la massima cura possibile, tale tipo di errori influenza sempre l'analisi e quindi i risultati di questa. La loro presenza è messa in evidenza dal fatto che, se per uno stesso campione si ripete più volte e con lo stesso metodo il dosaggio di un certo elemento, si ottengono in genere risultati diversi.
Benché non sia possibile correggerli, gli errori casuali possono essere ridotti codificando accuratamente il metodo di analisi, operando con grande cura ed attenzione e aumentando il numero di determinazioni. L'influenza degli errori casuali sui risultati analitici può essere stimata mediante l'analisi statistica dei risultati ottenuti in una serie di determinazioni ripetute.

2. Esattezza e precisione

Gli errori sistematici determinano il grado di esattezza del risultato: minore è l'entità di tali errori e più esatti sono i risultati di una determinazione. Gli errori casuali determinano invece la precisione del risultato analitico. Questa viene comunemente espressa in termini di dispersione dei risultati intorno alla loro media aritmetica cioè, quantitativamente, in termini di scarto quadratico medio o scarto tipo.
Una misura è da considerarsi esatta quando chi la esegue si è posto nelle condizioni speri-

mentali adatte, usa strumenti idonei e predispone l'apparecchiatura in modo che essa fornisca effettivamente le informazioni richieste. Una misura è da ritenersi precisa quando lo sperimentatore che l'ha eseguita è in grado di indicare, oltre al valore numerico di essa, l'entità degli effetti casuali dai quali essa è affetta.

3. Incertezza

Il concetto di incertezza, in quanto attributo quantificabile, è relativamente nuovo nella storia della misurazione, benché concetti come errore ed analisi dell'errore siano stati presenti a lungo nella pratica della scienza della misurazione o della metrologia. Attualmente è accettato che, allorquando tutte le componenti di errore, note o ipotizzate, siano state valutate e le relative correzioni apportate, rimanga tuttavia un'incertezza sulla correttezza del risultato.
"Incertezza" significa dubbio, pertanto "incertezza di misura" significa dubbio circa la validità del risultato di una misurazione, in altre parole l'incertezza rispecchia la mancanza di una conoscenza esatta del valore del misurando. Il risultato di una misurazione, anche dopo essere stato corretto per gli effetti sistematici identificati, è ancora solamente una stima del valore del misurando a causa dell'incertezza originata dagli effetti casuali e dalla non perfetta correzione del risultato per gli effetti sistematici. La definizione formale dell'incertezza è: "parametro, associato al risultato di una misurazione, che caratterizza la dispersione dei valori ragionevolmente attribuibili al misurando". Pertanto, mentre l'errore è un singolo valore, l'incertezza rappresenta un intervallo di valori che, ad un certo livello di fiducia stabilito, possono essere attribuiti al misurando.
L'incertezza in generale comprende più componenti. Alcune di queste possono essere valutate dalla distribuzione statistica dei risultati di una serie di misurazioni e possono essere caratterizzate mediante scarti tipo sperimentali (deviazioni standard). Le altre componenti, caratterizzabili anch'esse mediante scarti tipo, sono valutate da distribuzioni di probabilità ipotizzate sulla base dell'esperienza o di informazioni di altro tipo.

3.1 Metodologia per la valutazione dell'incertezza associata ad un risultato analitico

La guida EURACHEM/CITAC e la UNI CEI ENV 13005 "Guida all'espressione dell'incertezza di misura" forniscono indicazioni operative per valutare l'incertezza associata ad un risultato analitico. Nel riportare il risultato di una misurazione è necessario:

- specificare il misurando;
- descrivere chiaramente i metodi usati per calcolare il risultato di una misurazione e la sua incertezza dalle osservazioni sperimentali e dai dati di ingresso;
- identificare le sorgenti di incertezza e documentare in modo esauriente come esse sono state valutate;
- quantificare le componenti dell'incertezza;
- calcolare l'incertezza combinata o composta;
- presentare l'analisi dei dati in modo tale che ogni passaggio possa essere agevolmente seguito e che il calcolo del risultato riportato possa essere ripetuto in modo autonomo, se necessario;
- fornire le correzioni e le costanti utilizzate nell'analisi e le loro fonti.

La presentazione finale del risultato della misura analitica y e la sua incertezza tipo composta I_c sarà quindi:

$$Y = y \pm I_c(y).$$

In linea di massima, nell'analisi ambientale i principali contributi all'incertezza del risultato analitico finale sono identificabili nelle seguenti fonti:

- il campionamento, che comprende una serie di operazioni quali il prelievo del campione, la conservazione, il trasporto e l'immagazzinamento;

- la preparazione e il pre-trattamento del campione (essiccazione, omogeneizzazione, ripartizione, digestione, diluizione, estrazione, separazione);
- il processo analitico, ossia la misurazione del misurando in esame.

Traducendo in forma semplificata, l'incertezza combinata I_c di una misura analitica y può quindi ricondursi al contributo:

- dell'incertezza derivante dal campionamento = I_{camp};
- dell'incertezza derivante dal pre-trattamento del campione = I_{pc};
- dell'incertezza dovuta alla fase analitica = I_a.

La formula per calcolare l'incertezza tipo composta diventerà quindi:

$$I_c(y) = \sqrt{I_{camp}^2 + I_{pc}^2 + I_a^2}$$

I diversi contributi all'incertezza associata al risultato di un processo analitico possono essere efficacemente visualizzati tramite il diagramma causa-effetto (fishbone), come suggerito dalla guida EURACHEM/CITAC. Per "causa" si intende l'incertezza associata alla particolare operazione o procedura eseguita, mentre per "effetto" si intende l'incertezza globale associata ad esempio al risultato di una misurazione analitica o ad una fase dell'analisi ambientale che poi interverrà a sua volta come "causa" nel diagramma della misura analitica.
La guida EURACHEM/CITAC descrive anche i passi successivi per quantificare le incertezze. Non sempre può essere necessario o conveniente valutare tutte le componenti dell'incertezza separatamente, ovvero spesso è possibile effettuare esperimenti, quali gli studi interlaboratorio, da cui è possibile stimare incertezze cumulative senza avere la necessità di quantificarle separatamente. In alcuni casi, inoltre, è possibile che alcune incertezze, una volta quantificate, possano risultare trascurabili o che alcune incertezze non possano essere valutate. In questi casi può essere di aiuto l'esperienza degli operatori o i risultati di altre esperienze similari riportati nella bibliografia ufficiale. C'è anche da evidenziare il fatto che, considerando l'equazione sopra riportata dell'incertezza tipo composta, il fattore dell'incertezza dovuta alla fase analitica di un processo di misura, come riportato nella guida EURACHEM/CITAC, è valutabile in più modi, ad esempio tramite il confronto con materiali di riferimento oppure direttamente dalla relazione matematica che specifica il misurando e la corrispondenza con i diversi parametri dai quali dipende il misurando stesso. Al contrario, le componenti dell'incertezza dovute al campionamento e al pre-trattamento non sono così "facilmente" determinabili poiché di fatto non esistono materiali di riferimento "ad hoc" ed inoltre non è banale ricondurre l'operazione di campionamento ad una espressione matematica che correli i parametri dalla quale sia possibile stimare l'incertezza.

4. Valutazione statistica dei risultati sperimentali

Limitiamo ora la nostra attenzione allo studio degli errori casuali o accidentali, prescindendo dagli effetti dovuti agli errori sistematici che non possono essere identificati e valutati per mezzo di metodologie statistiche, ma che possono essere spesso minimizzati dalla opportuna scelta del metodo, dall'accortezza e dall'abilità dell'analista.
Gli errori casuali dipendono da circostanze perturbatrici che si verificano indifferentemente nei due sensi e che tendono a compensarsi all'aumentare del numero delle determinazioni. La misura di una grandezza, può quindi essere affetta da errori casuali sia positivi che negativi, la cui entità può essere valutata per mezzo di metodi statistici.

4.1 La distribuzione normale o di Gauss

Come accennato in precedenza, l'esecuzione di un'analisi è soggetta ad un gran numero di circostanze, le quali, agendo indipendentemente l'una dall'altra, fanno sì che l'effetto complessivo che determina il risultato sia accidentale.

Queste condizioni «perturbatrici» si verificano indifferentemente nei due sensi e tendono a compensarsi all'aumentare del numero delle determinazioni. Da ciò deriva che non esiste «a priori» alcun motivo per preferire un risultato al posto di un altro: si pone pertanto il problema di una rappresentazione dei risultati stessi che consenta di far fronte all'indeterminatezza sperimentale.
All'atto pratico si tratta di trovare un valore in grado di caratterizzare la serie dei risultati. A tale riguardo la media aritmetica, per la sua semplicità concettuale ed operativa, parrebbe l'operazione più congrua. Tra l'altro, sotto il profilo strettamente matematico, quando il numero delle determinazioni tende all'infinito, essa gode delle proprietà di avere per limite il valore vero della quantità misurata, mentre la somma delle differenze degli scarti da essa è uguale a zero.
Tuttavia la media aritmetica da sola non è in grado di rappresentare univocamente una serie di risultati, tant'è vero che serie con diversa variabilità possono avere la stessa media.
Si rende quindi necessario un valore statistico che esprima il modo con cui i singoli risultati sono distribuiti rispetto alla media aritmetica stessa.
Per la gran parte delle applicazioni della chimica analitica il parametro che più d'ogni altro viene utilizzato per definire la variabilità di una serie di misure «coerenti» (effettuate con lo stesso metodo, dallo stesso operatore, con gli stessi reagenti ecc.) è il cosiddetto «scarto quadratico medio» o «scarto» tipo s.
È possibile dimostrare che, ove gli errori seguano la distribuzione «normale» o di Gauss e la serie di misure sia sufficientemente numerosa, il 68,27% dei risultati non differisce dal valore medio più dello scarto tipo, il 95,46% più del doppio dello scarto tipo, il 99,72% più del triplo (vedi Fig. 1). Ma è lecito affermare che gli errori analitici seguono una legge del tipo:

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \cdot e^{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}}$$

nota come funzione normale di probabilità o funzione di Gauss dove σ è lo scarto tipo e μ è il valore medio.
È possibile verificare sperimentalmente che gli errori accidentali tendono a seguire la distribuzione di Gauss. Difatti una osservazione attenta dei risultati di un congruo numero di analisi «coerenti» mostra chiaramente che essi si distribuiscono attorno al valor medio, cosicché la differenza tra il numero degli scarti positivi e quello dei negativi diventa sempre più modesta all'aumentare del numero totale di essi, mentre gli scarti più grandi in valore assoluto si presentano con minor frequenza di quelli più piccoli. Intuitivamente ciò si spiega considerando che moltissime sono le cause, differenti l'una dall'altra che orientano in un senso o nell'altro il risultato sperimentale, per cui la loro azione combinata conduce con la stessa probabilità ad errori positivi o negativi; ugualmente è meno probabile che le stesse cause spingano tutte fortemente nello stesso senso.
È pertanto lecito affermare che alla misura che fornisce come risultato il valore x corrisponde un dato σ, tale che il valore vero avrà una probabilità del 68,27% di essere compreso tra $(x - \sigma)$ e $(x + \sigma)$, ovvero una probabilità del 95,46% di essere compreso tra $(x - 2\sigma)$ e $(x + 2\sigma)$ o infine una probabilità del 99,72% di essere compreso tra $(x - 3\sigma)$ e $(x + 3\sigma)$ (vedi Fig. 1).
Ugualmente è lecito predire l'esistenza di un valore vero al quale tende il valore medio quando il numero delle misure tende all'infinito.

4.2 Stima di μ e σ

Nella pratica ovviamente non si dispone di un numero particolarmente elevato di osservazioni sperimentali e quindi i valori effettivi dei parametri statistici μ e σ non sono determinabili. Tuttavia un numero seppure limitato di osservazioni disponibili consente di effettuare una stima di detti parametri mediante le seguenti espressioni, dove con $\bar{x}$ si indica la stima della media e con S si indica la stima dello scarto quadratico tipo:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{1}^{N} {}_i x_i}{N}$$

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{1}^{N} {}_i (x_i - \bar{x})^2}{N-1}}$$

ove le x_i (i = 1,2,.....,N) sono le osservazioni sperimentali. Quanto più numerosa è la serie delle determinazioni sperimentali, tanto migliori ed accurate sono le stime che $\bar{x}$ e S forniscono per i parametri μ e σ.
Per il calcolo di S è conveniente utilizzare la seguente espressione che si ottiene dalla precedente mediante semplici trasformazioni

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{1}^{N} {}_i x_i^2 - \frac{\left(\sum_{1}^{N} x_i\right)^2}{N}}{N-1}}$$

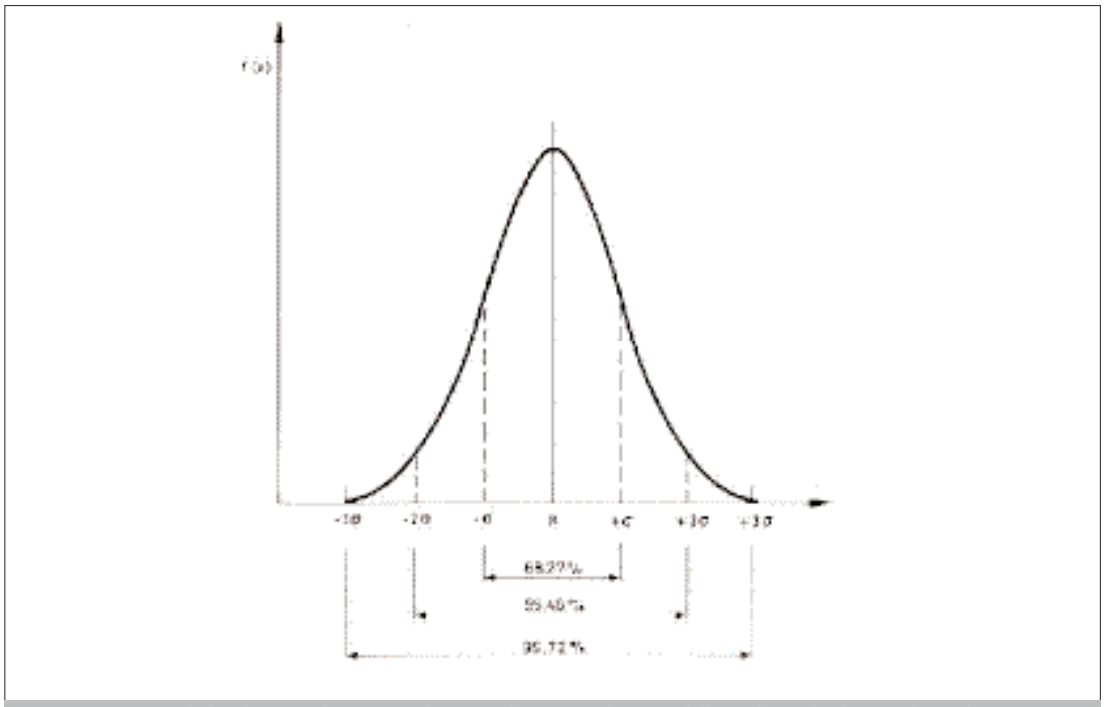


Figura 1: Funzione di distribuzione di una serie di misure di una grandezza x, delle quali μ è il valore medio e s lo scarto tipo.

In Tab. 1 si riporta, a titolo esemplificativo, il calcolo di S relativo ad una determinazione dell'ammoniaca in acqua con il metodo al fenolo-ipoclorito.
È bene rilevare che i diversi calcoli devono essere effettuati considerando tutte le cifre significative dei dati sperimentali: infatti i parametri statistici del tipo descritto risentono in misura notevole della sia pure piccola differenza tra le ultime cifre dei risultati sperimentali.
Le considerazioni esposte per una serie di singole determinazioni analitiche rimangono valide anche se tale serie è costituita da medie di gruppi di singole misure. Anche in questo caso è possibile definire lo scarto tipo della media (o deviazione standard della media) S_M che assume il significato di parametro caratteristico della distribuzione normale o di Gauss relativa alle medie di gruppi di determinazioni.

Tabella 1: Esempio: determinazione spettrofotometrica dell'ammoniaca nelle acque con il metodo al fenolo-ipoclorito nell'intervallo di concentrazione 2,5 - 50 µg/L (nella soluzione finale misurata); λ = 635 nm; b = 10 cm.

Taratura C (µg/L)	A (corretta del bianco medio)
bianco	0,092-0,095-0,100-0,115
2,5	0,028-0,035-0,032-0,037
5,0	0,120-0,115-0,100-0,100
10,0	0,183-0,180-0,175-0,172
15,0	0,245-0,250-0,255-0,250
20,0	0,329-0,330-0,325-0,330
25,0	0,415-0,420-0,400-0,410
30,0	0,482-0,487-0,467-0,477
40,0	0,680-0,665-0,685-0,675
50,0	0,835-0,830-0,820-0,840
x (campione incognito)	0,367-0,369-0,364-0,366 (assorbanza non corretta del bianco)

bianco medio = 0,1005
assorbanza media campione incognito = 0,3665
assorbanza media campione incognito corretta per il bianco = 0,3665-0,1005 = 0,2660
S bianco = 0,0106
S campione incognito = 0,00208

S netto = $\sqrt{(0{,}00208)^2 + (0{,}0106)^2} = 0{,}0108$

coefficiente angolare retta di taratura = 0,0165 ± 0,0001 (A/µg/L)
concentrazione campione incognito = 0,2660/0,0165 = 16,12 µg/L
Ipotizzando una relazione lineare tra assorbanza e concentrazione del tipo $y = a \cdot C_x$, quindi ricavando la concentrazione del campione incognito dal rapporto tra l'assorbanza media del campione incognito corretta per il bianco e il coefficiente angolare della retta, l'incertezza associata alla concentrazione del campione incognito è dato dalla formula

$$S_x = \sqrt{\left(\frac{S_y}{y}\right)^2 + \left(\frac{S_a}{a}\right)^2} \cdot C_x$$

dove:
S_y = scarto netto;
y = assorbanza media del campione incognito corretto per il bianco;
S_a = scarto sul coefficiente angolare;
a = coefficiente angolare;
C_x = concentrazione del campione incognito

$$S_x = \sqrt{\frac{0{,}00208^2}{0{,}2660^2} + \frac{0{,}0001^2}{0{,}0165^2}} \times 16{,}12 = 0{,}15948$$

Risultato C_x = (16,12 ± 0,16) µg/L = (16,1 ± 0,2) µg/L

In conformità a quanto già precedentemente osservato per il parametro S, lo scarto tipo della media, stimato sulla serie di osservazioni disponibili, è espresso da

$$S_M = \frac{S}{\sqrt{N}} = \sqrt{\frac{\sum_1^N (x_i - \bar{x})^2}{N(N-1)}}$$

Pertanto, mentre lo scarto tipo esprime l'incertezza relativa ad ogni singola determinazione, lo scarto tipo della media, S_M, esprime l'incertezza relativa alla media aritmetica delle diverse determinazioni sperimentali.

4.3 Intervallo di confidenza

Lo scarto tipo stimato S_M consente di determinare «l'intervallo di confidenza» della media,

cioè l'intervallo entro il quale debba trovarsi, ad un determinato livello di probabilità, il valore "vero" della grandezza da misurare. Ciò permette di ottenere un'idea sufficientemente rappresentativa del grado di approssimazione della media delle determinazioni sperimentali al valore vero incognito. Gli estremi inferiore e superiore dell'intervallo di fiducia della media sono espressi rispettivamente da

$$\bar{x} - t\frac{S}{\sqrt{N}} \quad e \quad \bar{x} + t\frac{S}{\sqrt{N}}$$

ove t è un coefficiente detto «coefficiente di Student», i cui valori dipendono dal livello di probabilità prescelto e dal numero dei «gradi di libertà» relativi allo scarto tipo delle determinazioni sperimentali disponibili (*).
È opportuno ricordare che i gradi di libertà per un parametro statistico sono espressi come differenza tra il numero N delle osservazioni sperimentali ed il numero dei vincoli a cui il parametro stesso è subordinato. Nel caso in esame, trattandosi di scarti di misure analitiche indipendenti, l'unico vincolo è che la somma algebrica degli scarti dalla media deve essere nulla: pertanto i gradi di libertà sono N-1. In Tab. 2 sono riportati i valori del coefficiente t di Student per diversi gradi di libertà e diversi livelli di probabilità.

Tabella 2: Valori della variabile t di Student

G.d.L.	Livello di probabilità %						
	50	40	30	20	10	5	1
1	1,000	1,376	1,963	3,078	6,314	12,706	63,657
2	0,816	1,061	1,386	1,886	2,920	4,303	9,925
3	0,765	0,978	1,250	1,638	2,353	3,182	5,841
4	0,741	0,941	1,190	1,533	2,132	2,776	4,604
5	0,727	0,920	1,156	1,476	2,015	2,571	4,032
6	0,718	0,906	1,134	1,440	1,943	2,447	3,707
7	0,711	0,896	1,119	1,415	1,895	2,365	3,499
8	0,706	0,889	1,108	1,397	1,860	2,306	3,355
9	0,703	0,883	1,100	1,383	1,833	2,262	3,250
10	0,700	0,879	1,093	1,372	1,812	2,228	3,169
11	0,697	0,876	1,088	1,363	1,796	2,201	3,106
12	0,695	0,873	1,083	1,356	1,782	2,179	3,055
13	0,694	0,870	1,079	1,350	1,771	2,160	3,012
14	0,692	0,868	1,076	1,345	1,761	2.145	2,977
15	0,691	0,866	1,074	1,341	1,753	2,131	2,947
16	0,690	0,865	1,071	1,337	1,746	2,120	2,921
17	0,689	0,863	1,069	1,333	1,740	2,110	2,898
18	0,688	0,862	1,067	1,330	1,734	2,101	2,878
19	0,688	0,861	1,066	1,328	1,729	2,093	2,861
20	0,687	0,860	1,064	1,325	1,725	2,086	2,845
21	0,686	0,859	1,063	1,323	1,721	2,080	2,831
22	0,686	0,858	1,061	1,321	1,717	2,074	2,819
23	0,685	0,858	1,060	1,319	1,714	2,069	2,807
24	0,685	0,857	1,059	1,318	1,711	2,064	2,797
25	0,684	0,856	1,058	1,316	1,708	2,060	2,787
26	0,684	0,856	1,058	1,315	1,706	2,056	2,779
27	0,684	0,855	1,057	1,314	1,703	2,052	2,771
28	0,683	0,855	1,056	1,313	1,701	2,048	2,763

segue

(*) Nel caso sia stata effettuata una sola misura sperimentale x e sia già noto il valore di S, gli estremi dell'intervallo fiduciale di tale misura sono espressi da (x - tS) e (x +tS).

segue

Tabella 2: Valori della variabile t di Student

G.d.L.	Livello di probabilità %						
	50	40	30	20	10	5	1
29	0,683	0,854	1,055	1,311	1,699	2,045	2,756
30	0,683	0,854	1,055	1,310	1,697	2,042	2,750
40	0,681	0,851	1,050	1,303	1,684	2,021	2,704
50	0,680	0,849	1,048	1,299	1,676	2,008	2,678
60	0,679	0,848	1,046	1,296	1,671	2,000	2,660
120	0,677	0,845	1,041	1,289	1,658	1,980	2,617
-	0,674	0,842	1,036	1,282	1,645	1,960	2,576

4.4 Confronto fra risultati

La conoscenza del parametro S, oltre a permettere la stima dell'intervallo di fiducia della media delle misure, consente di eseguire confronti tra risultati diversi, per mezzo di opportuni test statistici. Supponiamo ad esempio che uno stesso analista abbia determinato la concentrazione di cadmio in due campioni di acqua prelevati in tempi diversi da uno stesso fiume ed abbia eseguito su ciascun campione 5 misure indipendenti con lo stesso metodo di analisi, ottenendo i seguenti valori:

Campione 1	Campione 2
21,8 µg/L	23,9 µg/L
24,5 "	28,4 "
23,3 "	26,9 "
27,6 "	30,4 "
23,2 "	26,4 "
$\bar{x}_1$ = 24,1 µg/L	x_2 = 27,2 µg/L

L'analista potrà chiedersi se le concentrazioni di cadmio nei due campioni sono effettivamente diverse, o se la differenza tra due medie possa derivare semplicemente dalla dispersione delle misure eseguite.
Per rispondere a ciò, egli potrà eseguire un test, comunemente chiamato «test t», che gli permetterà di valutare, con una certa probabilità, se le due medie possano o non possano essere considerate stime diverse di uno stesso valore di concentrazione di cadmio. Prima di tutto fisserà il livello di significatività del test, cioè la probabilità che la valutazione dedotta dal test non sia vera: in genere sceglierà il livello di significatività 5%, con il quale la sua valutazione avrà 95 probabilità su 100 di essere corretta. Calcolerà poi gli scarti tipo S_1 = 2,2 µg/L e S_2 = 2,4 µg/L della serie di misure dei due campioni.
Dovendo confrontare due medie calcolate da un egual numero di misure ($N_1 = N_2 = 5$) gli sarà sufficiente calcolare il rapporto

$$\frac{(\bar{x}_1-\bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{(S_1^2+S_2^2)}{N}}} = 2{,}2 \ (*)$$

e confrontarlo con il valore del coefficiente di Student al livello di probabilità prescelto e per

(*) Nel caso di medie calcolate da numerosità di misure diverse il rapporto assume la forma più generale

$$t = \frac{(\bar{x}_1-\bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{S_1^2}{n_1}+\frac{S_2^2}{n_2}}}$$

dove n_1 ed n_2 (entrambi molto maggiori di 1) sono rispettivamente la numerosità di misure da cui sono derivate le medie. Il valore di t ottenuto va confrontato con il valore critico (Tab. 2) in corrispondenza di $n_1 + n_2 - 2$ gradi di libertà.

il numero di gradi di libertà (2N-2 = 8) degli scarti tipo. Tale valore, pari a 2,306 (vedi Tab. 2), risulterà più grande di quello calcolato per il rapporto, per cui l'analista potrà affermare che, con più di 95% di probabilità, i due valori medi ottenuti sono stime diverse di una stessa concentrazione: potrà quindi affermare che le concentrazioni di cadmio nei due campioni sono effettivamente uguali con 95 probabilità su 100.
Il «test t» sopra illustrato non è che un esempio dei molti test statistici che trovano utile applicazione nella valutazione o nel confronto dei risultati di analisi chimiche: tra essi citiamo il «test di Dixon», per il confronto tra più risultati; il «test F», per il confronto tra due scarti tipo, il «test» del «χ^2», per il confronto tra due scarti tipo.
Ciascuno di questi test permette di eseguire un'analisi dei risultati con rigore matematico, e le affermazioni che se ne deducono hanno una validità oggettiva, se pur in termini probabilistici.
È necessario però dedicare molta attenzione affinchè il test, e quindi il confronto, venga eseguito correttamente. Nel caso sopracitato, ad esempio, il confronto è stato possibile solo in quanto le due medie si riferivano a misure eseguite con lo stesso metodo e dallo stesso analista, e gli scarti tipo S_1, ed S_2 potevano essere considerati stime della dispersione di misure ottenute in questo modo.
Se i due campioni fossero stati analizzati con metodi diversi, o anche con lo stesso metodo ma da laboratori diversi, il confronto non si sarebbe potuto eseguire con le modalità sopra descritte. Infatti la differenza tra le due medie sarebbe stata determinata non soltanto dalle cause di dispersione delle misure eseguite in quel particolare laboratorio, e con quel particolare metodo, ma anche dalla possibile dispersione derivante dalle diverse condizioni sperimentali dei due metodi o dei due laboratori. Nel caso di metodi diversi, inoltre, occorre tenere presente che la differenza tra le due medie poteva derivare anche dalla differente accuratezza dei due metodi (*).

5. Ripetibilità e riproducibilità

Si è visto nel paragrafo precedente, che per confrontare i risultati di analisi eseguite in laboratori diversi, anche supponendo che sia stato usato lo stesso metodo di analisi non è sufficiente valutare la dispersione tra misure eseguite da uno stesso analista o in uno stesso laboratorio, ma è necessario valutare anche la dispersione di misure eseguite con lo stesso metodo ma in laboratori diversi.
Nel parlare di precisione delle misure, ottenute con uno stesso metodo, è opportuno quindi distinguere a seconda delle cause di variabilità prese in considerazione, facendo ricorso ai termini seguenti:

- ripetibilità: grado di concordanza tra misure della stessa grandezza (quantità o concentrazione) nella stessa matrice, ottenute con lo stesso metodo, da uno stesso analista con gli stessi reattivi e le stesse apparecchiature, in un arco di tempo ragionevolmente breve;
- riproducibilità: grado di concordanza tra misure della stessa grandezza (quantità o concentrazione) nella stessa matrice, ottenute con lo stesso metodo in laboratori diversi.

Analogamente, gli scarti tipo che forniscono la stima della variabilità delle misure eseguite nelle condizioni di cui sopra vengono chiamati scarto tipo di ripetibilità e scarto tipo di riproducibilità.
I concetti di ripetibilità e di riproducibilità, insieme con quello di esattezza, sono presentati schematicamente in Fig. 2. In essa viene illustrata una serie di risultati di misure di una stes-

(*) In effetti il confronto tra risultati ottenuti con lo stesso metodo da laboratori diversi non presenta particolari difficoltà, mentre quello fra risultati ottenuti con metodi diversi è sempre affetto dalla difficoltà di valutare correttamente l'accuratezza dei due metodi, anche in uno stesso laboratorio. Da queste difficoltà deriva l'opportunità di adottare, per la determinazione di una sostanza in una stessa matrice, un metodo unificato.

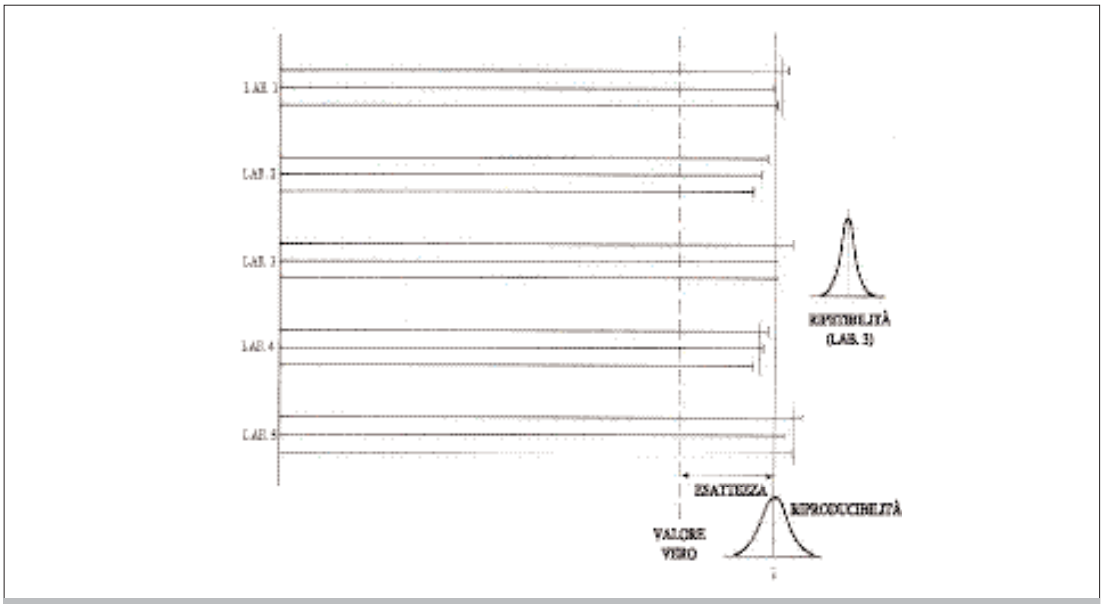


Figura 2: Rappresentazione schematica dei concetti di precisione ed esattezza.

sa grandezza in uno stesso campione, eseguita da più laboratori; tali risultati sono schematizzati da linee orizzontali.
Si può notare che ogni laboratorio ha eseguito tre misure indipendenti della grandezza, ottenendo con ciascuna misura un risultato leggermente diverso: per ciascun laboratorio viene riportato quindi un tratto rettilineo verticale, in corrispondenza della media dei risultati ottenuti. Per il laboratorio n. 3 viene riportata anche una curva di distribuzione, che illustra la dispersione delle misure ottenute da quel laboratorio, e quindi la ripetibilità delle sue misure.
Il segmento verticale contrassegnato con $\bar{x}$ corrisponde alla media generale di tutti i risultati, e la curva di distribuzione ad esso associata illustra la dispersione tra le misure dei diversi laboratori, e quindi la riproducibilità delle misure. La differenza tra il segmento verticale contrassegnato con $\bar{x}$ e quello tratteggiato, che corrisponde al valore vero della grandezza misurata, illustra l'esattezza delle misure.
Mentre la ripetibilità delle misure eseguite con un certo metodo può essere valutata con relativa facilità, effettuando una serie di misure in uno stesso laboratorio, la riproducibilità delle misure richiede l'organizzazione e l'esecuzione di prove interlaboratorio.
Tali prove devono coinvolgere un numero più o meno elevato di laboratori, opportunamente scelti; è, infatti, evidente che la riproducibilità delle misure può dipendere anche fortemente dalle caratteristiche dei laboratori coinvolti.

6. Caratteristiche di un metodo di analisi

6.1 Ripetibilità, riproducibilità ed esattezza

Ripetibilità, riproducibilità ed esattezza sono caratteristiche analitiche dei risultati ottenuti con un certo metodo: esse però vengono spesso estese allo stesso metodo di analisi, intendendo con riproducibilità di un metodo, ad esempio, la riproducibilità dei risultati ottenuti con il metodo stesso. Tale estensione, che a rigore non sarebbe accettabile, è entrata ormai nel linguaggio comune.
Essa può essere accettata solo tenendo presente che l'esattezza e la dispersione delle misure ottenute con un certo metodo possono dipendere fortemente dalle caratteristiche del laboratorio (o dei laboratori) in cui le misure vengono eseguite; e che la dispersione dei risultati dipende in genere dal valore della grandezza che viene misurata.
Per definire la ripetibilità, la riproducibilità di un metodo è quindi necessario aver cura di utilizzare laboratori opportunamente scelti tra quelli che presumibilmente dovranno applicare il

metodo stesso, o con caratteristiche simili ad essi, eseguendo prove interne e prove interlaboratorio.
È necessario, inoltre, effettuare le prove in modo da ottenere informazioni su ripetibilità, riproducibilità del metodo per diversi valori della grandezza da misurare, e trovare una correlazione, anche empirica, tra tali caratteristiche ed il valore della grandezza.
Infine, non si deve trascurare il fatto che tali caratteristiche dipendono anche dal grado di esattezza con cui vengono fornite le istruzioni per applicare il metodo di analisi.
È quindi opportuno eseguire le prove interlaboratorio distribuendo ai partecipanti il metodo di analisi redatto nella sua forma definitiva: qualsiasi variazione successiva nella redazione del metodo potrebbe infatti causare una variazione delle caratteristiche del metodo stesso.

6.2 Limite di rivelabilità

Un'altra caratteristica importante di un metodo di analisi è il suo «limite di rivelabilità».
La conoscenza di tale limite non è soltanto una informazione su quale sia il valore minimo della grandezza misurata (quantità o concentrazione) rivelabile con un certo metodo, ma permette anche di esprimere correttamente un risultato di analisi quando nel campione analizzato il valore della grandezza misurata non è risultato significativamente diverso da zero (valore del bianco).
Non esiste una definizione universalmente accettata di limite di rivelabilità, nè vi è accordo sul modo con cui determinarlo.
Tra le varie definizioni, si ritiene che la più corretta ed adeguata sia la seguente: il limite di rivelabilità di un metodo di analisi è il valore minimo delle grandezze da misurare (quantità o concentrazione), che dà luogo ad un risultato che ha una certa probabilità (generalmente il 95%) di essere valutato statisticamente maggiore del risultato che si sarebbe ottenuto se in quello stesso campione la grandezza avesse avuto valore zero (bianco).
Il limite di rivelabilità è quindi strettamente correlato alla ripetibilità del metodo, in quanto si tratta in pratica di un confronto tra due valori ipotetici ottenuti dallo stesso analista, con gli stessi reattivi ed apparecchiature e nello stesso momento.
Ciò appare evidente in Fig. 3. Per poter essere riconosciuto diverso dal valore di zero, un risultato deve essere superiore ad A.
Per ottenere ciò, però, non è sufficiente che il valore della grandezza sia superiore ad A: se la grandezza ha il valore B in figura, ad esempio, la probabilità di ottenere un risultato inferiore ad A è piuttosto elevata.
Solo quando il valore della grandezza è pari ad L_R la probabilità di ottenere un risultato inferiore ad A si limita al 5%.
Su queste basi, il limite di rivelabilità di un metodo risulta pari a:

$$L_R = tS_0 + tS_L = t\,(S_0 + S_L)$$

dove t è il coefficiente di Student al livello di probabilità 95%, mentre S_0 ed S_L sono gli scarti tipo di ripetibilità del risultato per un livello della grandezza pari a zero ed a L_R rispettivamente. Poiché normalmente $S_0 = S_L$ si avrà:

$$L_R = 2t \cdot S_0.$$

Come si è già accennato, la conoscenza del limite di rivelabilità di un metodo è particolarmente utile quando si debba esprimere il risultato di un'analisi nella quale il valore della grandezza misurata non è risultato significativamente diverso da zero. Non è corretto infatti riportare zero come risultato dell'analisi, ma è necessario riportare che la grandezza misurata è risultata inferiore al limite di rivelabilità L_R.

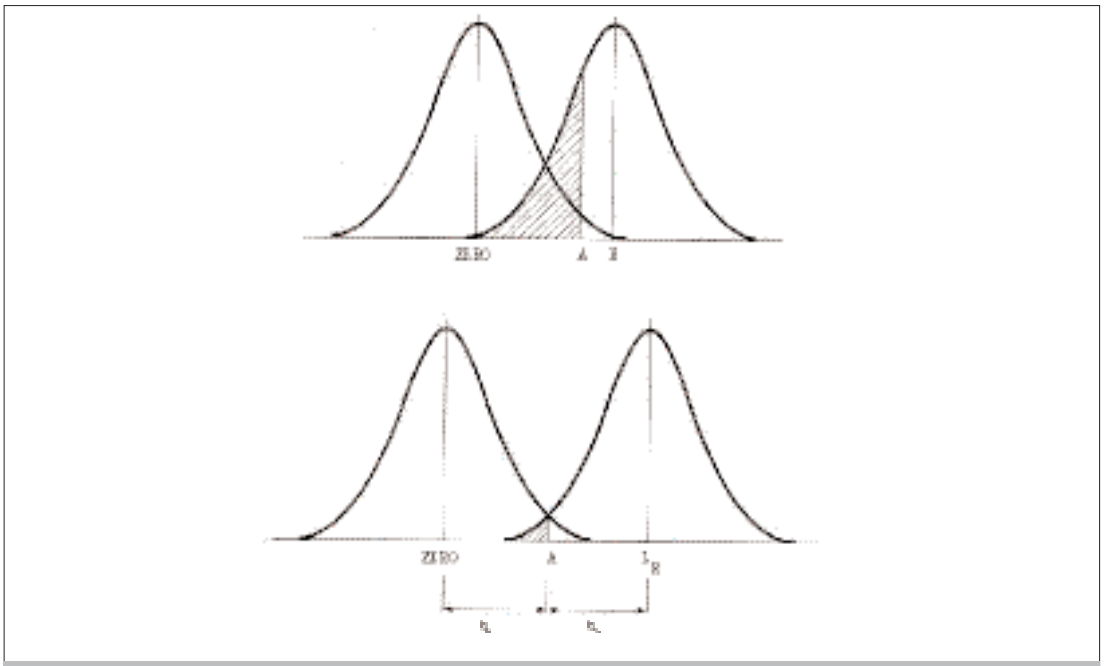


Figura 3: Rappresentazione schematica del concetto di limite di rivelabilità.

7. La validazione del dato analitico

L'affidabilità del dato analitico è assicurata dalle seguenti condizioni:

- il laboratorio che esegue la misura deve seguire le procedure periodiche di controllo di qualità (carte di controllo ecc.);
- il laboratorio che esegue la misura deve utilizzare metodi analitici normati o armonizzati a livello nazionale e/o internazionale;
- il laboratorio che esegue la misura deve partecipare periodicamente ad esercizi di interconfronto.

8. Strumenti a disposizione per l'assicurazione della qualità delle analisi

Le procedure autonomamente adottate e regolarmente applicate all'interno dei laboratori per l'assicurazione della qualità delle analisi possono essere numerose e diversificate a seconda delle tipologie di campioni che vengono analizzati (acque di pioggia, acque correnti, lacustri o di falda, acque reflue o di impianto industriale, ecc.), e della maggiore o minore omogeneità delle matrici. Una importante differenza risiede inoltre nelle procedure adottabili in laboratori che svolgono attività ripetitive (controllo, monitoraggio, ecc.) rispetto a quelle applicabili nel caso di laboratori di ricerca o in quelli che effettuano analisi saltuarie di matrici acquose. Un elenco generale delle principali operazioni è riportato in Tab. 3, nella quale sono stati selezionati i controlli più comuni adottabili nel caso di laboratori di medie dimensioni (4-5 analisti) con una sufficiente cadenza di operazioni analitiche (ad esempio circa 20-30 campioni settimanali) solo su matrici acquose omogenee.
La distinzione indicata in tabella tra operazioni continue e periodiche è da considerarsi in tutti i casi orientativa ed esemplificativa. In altri termini, in un piano di qualità si deve distinguere tra le procedure da compiere costantemente ad ogni analisi e quelle che invece è sufficiente effettuare con periodicità. Naturalmente i casi che si possono annoverare a questo proposito sono infiniti e dipendono essenzialmente dalla tipologia del metodo analitico, dall'analita e dalla sua concentrazione. Nei casi più favorevoli di misure di specie macrocostituenti stabili con metodi selettivi e con elevate precisioni, è relativamente semplice condurre una distinzio-

Tabella 3: Principali controlli di qualità interni che devono essere effettuati per garantire la qualità dei risultati analitici nella determinazione di analiti nelle acque.

Controllo	Periodicità
Controllo dell'acqua reagente	P
Controllo dei reagenti	C
Tarature con standard	P
Determinazione dei limiti di rilevabilità e quantificazione	P
Analisi di duplicati	C
Carte di controllo	C
Analisi di campioni con riferimenti interni	P
Analisi di campioni certificati	P
Controllo delle unità di misura e dei calcoli dei risultati	C
Controllo della consistenza interna delle analisi	C
Confronto con dati pregressi	C(*)
Confronto dei risultati ottenuti in interconfronti tra laboratori	P

C: continuo; P: periodico; (*) quando possibile.

ne operativa tra procedure continue e periodiche. In generale però tali situazioni sono circoscritte a poche variabili (specie di origine geochimica: metalli alcalini ed alcalino-terrosi, solfati, cloruri, ecc.; nutrienti: nitrati, ecc.). Molto più comune è invece il caso della determinazione di specie poco stabili, a basse concentrazioni ed in presenza di interferenze. In queste situazioni le periodicità dei controlli devono essere profondamente riviste ed in taluni casi è comune considerare come normali anche numeri di repliche, bianchi di controllo, riferimenti interni, controlli delle tarature, ecc., che possono giungere a rappresentare oltre la metà dei campioni analizzati.
Una delle fasi delle operazioni analitiche che richiedono una verifica costante sono le procedure di calcolo dei risultati e della loro trascrizione finale. Molto frequenti sono, infatti, i casi di errori commessi in fasi esterne alle procedure chimico-analitiche o fisiche vere e proprie, a seguito dell'abitudine alla effettuazione di calcoli ripetitivi, al mancato controllo degli ordini di grandezza in caso di operazioni automatiche oppure all'errata trascrizione materiale dei numeri.
Gli strumenti a disposizione del laboratorio per valutare ed incrementare la qualità delle prestazioni analitiche sono molteplici. Tra questi i più importanti sono certamente l'utilizzo di materiali di riferimento (certificati e non) e la partecipazione a studi interlaboratorio ("proficiency testing", "intercomparison exercise", "interlaboratory study", "round robin").
Oltre agli strumenti precedentemente citati, all'interno di un singolo laboratorio, il controllo di qualità sui risultati ottenuti comprende una serie di provvedimenti, tra cui:

- la determinazione di un bianco reagenti o, meglio ancora, di un bianco del metodo, che tenga conto di tutte le possibili contaminazioni provenienti dalla strumentazione utilizzata durante l'analisi;
- l'utilizzo di campioni di controllo di qualità, caratterizzati da una verificata stabilità nel tempo;
- la ripetizione delle analisi;
- l'effettuazione di eventuali prove di recupero.

Il controllo di qualità è una verifica che le fluttuazioni osservate nei risultati di analisi ripetute rientrino in un certo intervallo di accettabilità. La ripetizione della misura di un campione di riferimento risulta pertanto essere un sistema di monitoraggio comunemente utilizzato.

8.1 Materiali di riferimento

Si tratta di materiali caratterizzati da un'elevata omogeneità dell'analita, sottoposti ad una preparazione molto accurata da parte di enti preposti. Le linee Guida ISO 34:1996 stabiliscono la corretta procedura per la preparazione di materiali di riferimento. Qualora il mate-

riale di riferimento venga sottoposto ad un processo di certificazione, allora diventa un materiale di riferimento certificato; tale processo deve essere in accordo con le Linee Guida ISO 35:1989, che riguardano proprio "I principi generali e statistici da seguire nella certificazione di materiali di riferimento".
I materiali di riferimento vengono utilizzati per la validazione di un metodo, per la riproducibilità di un metodo nel tempo, ad esempio mediante la compilazione di una carta di controllo, e per la valutazione dell'esattezza di un metodo analitico. Caratteristiche essenziali di tali materiali sono l'elevata omogeneità e la stabilità nel tempo degli analiti.
I risultati analitici possono essere ritenuti accurati e confrontabili su scala internazionale soltanto se riferibili.
La riferibilità di un risultato può essere raggiunto tramite una catena ininterrotta di interconfronti in grado di collegare il processo di misura ad unità del Sistema Internazionale SI.
Spesso nelle analisi chimiche tale catena risulta interrotta in quanto il trattamento dei campioni porta alla distruzione fisica degli stessi. È necessario dimostrare che durante il trattamento del campione non vi siano contaminazione del campione e/o perdite degli analiti di interesse.
I materiali di riferimento sono uno strumento molto utile per il controllo di qualità, in quanto rappresentano la sola maniera a disposizione dei laboratori per garantire l'affidabilità delle procedure analitiche utilizzate.

8.1.1 Materiali di Riferimento Certificati (CRM)

La preparazione di materiali di riferimento certificati è un processo che comporta un notevole dispendio di tempo, risorse economiche e tecnico-scientifiche.
I materiali di riferimento certificati risultano quindi dei materiali molto costosi ed il loro utilizzo dovrebbe essere limitato. L'utilizzo appropriato dei materiali di riferimento certificati è chiaramente specificato in apposite direttive dell'ISO; in particolare la ISO Guide 32:1997 si occupa della taratura in chimica analitica e dell'utilizzo di CRM, mentre la ISO Guide 33:1989 riguarda l'utilizzo dei CRM.
In particolare i CRM dovrebbero essere utilizzati per:

- verificare l'accuratezza dei risultati ottenuti in laboratorio;
- tarare strumentazione che richiede materiali simili alla matrice (p.es. Spettrometria a raggi X);
- dimostrare l'equivalenza tra metodi differenti;
- individuare errori nella applicazione di metodi normati (p.es. ISO, ASTM, ecc.).
- "testare" materiali di riferimento non certificati, e quindi meno costosi, che possono essere successivamente utilizzati per il controllo di qualità di routine.

L'utilizzo di materiali di riferimento certificati durante la validazione di un metodo assicura che i risultati siano riferibili, ovvero che il risultato finale possa essere messo in relazione con il sistema internazionale delle unità di misura; consente inoltre di verificare se la procedura utilizzata è più o meno adeguata allo scopo prefisso.
Nel caso di non disponibilità di CRM in matrici confrontabili ai campioni oggetto dell'analisi, l'uso di CRM di composizione diversa non è sufficiente a garantire l'affidabilità e la riferibilità dei risultati. L'utilizzo del maggior numero di CRM con composizione il più possibile simile ai campioni incogniti riduce il rischio di produrre dati non affidabili.
Alcuni tra i più importanti enti di certificazione a livello mondiale sono riportati in Tab. 4.
Nel caso particolare dell'analisi di acque, sono disponibili numerosi materiali di riferimento; due grandi enti di certificazione, quali NIST e BCR coprono vari campi di analisi, assicurando una disponibilità a lungo termine di CRM. La maggiore fonte di informazione sui materiali di riferimento è la Banca Dati COMAR, situata nel "Laboratoire National d'Essais" (LNE), in Francia, nata per iniziativa di LNE, BAM (Germania) e LGC (Regno Unito). I CRM possono essere campioni compositi, composti da una miscela di vari campioni, campioni simulati, preparati per uno scopo particolare, o campioni "fortificati", con l'aggiunta di opportune quantità di analita. Dall'elenco di alcuni CRM riportato in Tab. 5, risulta evidente che la maggior

Tabella 4: Elenco dei più importanti Enti di Certificazione nel mondo	
SM&T-BCR	Standard Measurements and Testing Programme - European Commission Reference Bureau of Standards
NIST	National Institute for Standards and Technology - USA
NRC	National Research Council - Canada
NIES	National Institute for Environmental Sciences - Giappone
IAEA	International Atomic Energy Agency - ONU – Austria
NRCCRM	National Research Centre for Certified Reference Materials - Cina
LGC	Laboratory Government Chemist - UK
NWRI	National Water Research Institute - Canada
BAM	Bundesanshalt fur Materialforshung und Prufung - Germania

parte dei componenti certificati in materiali di riferimento acquosi sono di natura inorganica. Tuttavia è in fase di preparazione una serie di CRM di nuova generazione in cui vengono presi in considerazione anche componenti a stabilità inferiore, quali ad esempio i composti organofosforici e le triazine.
Da un'indagine recentemente svolta sui CRM in soluzione acquosa attualmente reperibili (Tab. 5) è emerso che per i costituenti maggiori esistono numerosi CRM relativi a deposizioni umi-

Tabella 5: Elenco di alcuni CRM disponibili presso tre diversi enti di certificazione (BCR, NRC e NIST) per l'analisi di acque

Tipo di matrice acquosa	Analita(i)	Nominativo da catalogo	Ente di certificazione
Acqua liofilizzata	Cr III/VI, Cr	CRM 544	BCR
	Pesticidi	CRM 606	BCR
Acqua distillata fortificata	Elementi maggiori	ION-92	NWRI
	Elementi in traccia	TM-23-28	NWRI
	Elementi in traccia	TM-DA-51-54	NWRI
Acqua naturale	Elementi maggiori	ION-94	NWRI
	Hg	SRM 1641c	NIST
	Elementi in traccia	SRM 1640	NIST
	Elementi in traccia	SRM 1643d	NIST
Acqua piovana			
sintetica	Elementi maggiori (b.c.)	CRM 408	BCR
	Elementi maggior (a.c.)	CRM 409	BCR
	Elementi maggiori ed elementi in traccia	SRM 2694a	NIST
centrifugata	Elementi maggiori	GBW 08627-9	NRCCRM
	Elementi maggiori	GRM-02	NWRI
Acqua di falda			
artificiale	Elementi maggiori (b.c. e a.c.)	CRM 616-617	BCR
naturale	Elementi in traccia (b.c. e a.c.)	CRM 609-610	BCR
	Br (b.c. e a.c.)	CRM 611-612	BCR
Acqua dolce	NO_3 (b.c.)	CRM 479	BCR
	NO_3 (a.c.)	CRM 480	BCR
	Elementi maggiori (b.c. e a.c.)	CRM 398 - 399	BCR
Acqua di lago			
fortificata	Elementi maggiori	ION-20	NWRI
durezza media	Elementi maggiori	ION-95	NWRI
durezza bassa	Elementi maggiori	ION-911	NWRI
	Elementi maggiori	AUD-6	NWRI
	Elementi maggiori	HURON-03	NWRI
Acqua di fiume			
Durezza elevata	Elementi maggiori	ION-911	NWRI
Durezza media	Elementi maggiori	SOUR-01	NWRI
Acqua di estuario	Elementi in traccia	SLRS-3	NRC
	Elementi in traccia	CRM 505	BCR
	Elementi in traccia	SLEW-2	NRC
Acqua di mare	Elementi in traccia	CRM 403	BCR
	Hg	CRM 579	BCR
	Elementi in traccia	CASS-3	NRC
	Elementi in traccia	NASS-4	NRC

de, ad acqua di lago e ad acqua di fiume, mentre per gli elementi in traccia i CRM reperibili sono per la maggior parte relativi ad acqua di fiume, acqua di estuario e acqua di mare. In entrambi i casi esiste un elevato numero di CRM in acqua distillata detti CRM "fortified".
Per quanto riguarda gli elementi maggiori ed i principali parametri chimico-fisici (Tab. 6) è stato riscontrato che l'acidità è certificata solo per acque piovane, mentre non esistono CRM di alcun tipo per la CO_2 totale per la quale invece sono disponibili solo valori raccomandati in campioni di acqua di mare. Nè ioduro, nè bromuro risultano certificati in alcun materiale ed il fosfato è certificato solo per acqua di mare e acqua di falda, mentre in altri tipi di matrice sono forniti solo valori raccomandati. In generale in acqua di mare e di estuario risulta certificato solo un numero molto piccolo di costituenti maggiori.
In considerazione del grande numero di analisi sui nutrienti presenti nell'ambiente marino, è da sottolineare come non siano ancora disponibili CRM per il contenuto totale di azoto e per il contenuto totale di fosforo; inoltre non esistono CRM di acque minerali, caratterizzate da un proprio specifico contenuto minerale.
Per quanto riguarda gli elementi in traccia (Tab. 6), risulta che Al, Fe e Mn sono certificati in un ampio spettro di matrici acquose, mentre per Ag, Bi, Sn, Ti e U sono disponibili solo valori raccomandati. Infine non esistono valori certificati, nè raccomandati per elementi delle terre rare ed altri elementi minori che pure trovano oggigiorno vasto impiego in varie branche dell'industria, sia come catalizzatori che nella composizione di superconduttori e componenti elettronici.
Uno dei maggiori limiti alla preparazione di CRM è la scarsa stabilità di alcuni analiti nel tempo, specialmente quando presenti a livello di tracce. A tal proposito, soprattutto nel caso di CRM di elementi in traccia in matrice acquosa, particolare attenzione deve essere riservata alla conservazione dei campioni sia subito dopo la fase di campionamento che durante le fasi di preparazione e di successiva distribuzione del materiale di riferimento. Tra i vari fattori da prendere in considerazione risultano particolarmente importanti la scelta adeguata dei materiali e del pH a cui stabilizzare l'analita o gli analiti d'interesse.
Negli ultimi anni sono stati sviluppati nuovi approcci che consentono la preparazione di CRM impensabili in passato, basati ad esempio sulla preparazione di soluzioni liofilizzate per certificare il contenuto organico.

Tabella 6: Disponibilità di CRM in funzione dei parametri certificati e/o raccomandati; la X maiuscola corrisponde ad un valore certificato, mentre la x minuscola corrisponde ad un valore raccomandato

Tipo di analita		Acqua distillata/ fortificata	Acqua naturale	Acqua di falda	Acqua piovana	Acqua dolce	Acqua di lago	Acqua di fiume	Acqua di estuario	Acqua di mare
Principali parametri chimico-fisici	Conducibilità	-	X	-	XXXX	-	XXXXX	XX	-	-
	Salinità	-	-	-	-	-	-	-	-	X
	Acidità	-	-	-	XXXX	-	-	-	-	-
	Alcalinità	X	X	-	-	-	XXXXX	XX	-	-
	Torbidità	X	X	-	X	-	XXXXX	XX	-	-
	Colore	X	X	-	X	-	XXXXX	XX	-	-
	Durezza	X	X	-	X	-	XXXXX	XX	-	-
	pH	X	X	-	XXXX	-	XXXXX	XX	-	-
	CO_2 totale	-	-	-	-	-	-	-	-	(x)
Elementi maggiori e loro composti inorganici	F	-	X	-	XXXXX	-	XXXXX	XX	-	-
	Cl	XX	X	X	XXXXX	X	XXXXX	XX	-	-
	NO_3	X	(x)	X	XXXXX	X	X	-	-	X
	$NO_3 + NO_2$	X	X	-	X	-	XXXXX	X(x)	-	X
	NH_4	X	X	-	XXXXX	-	XX(x)XX	(x)(x)	-	-
	PO_4	-	(x)	X	-	(x)	(x)(x)	(x)(x)	-	X
	Si	-	X	-	X	-	XXXXX	XX	-	X
	SO_4	XX	X	X	XXXXX	X	XXXX	XX	-	-

segue

segue

Tipo di analita		Acqua distillata/ fortificata	Acqua naturale	Acqua di falda	Acqua piovana	Acqua dolce	Acqua di lago	Acqua di fiume	Acqua di estuario	Acqua di mare
Elementi maggiori e loro composti inorganici	K	X	X	-	XXXXX	X	XXXXX	XXX	-	-
	Na	X	X	X	XXXXX	X	XXXXX	XXX	-	-
	Ca	X	X	X	XXXXX	X	XXXXX	XXX	-	-
	Mg	X	X	X	XXXXX	X	XXXXX	XXX	-	-
	B	-	(x)	-	-	-	(x)(x)	(x)(x)	-	-
	DOC	X	X	-	X	-	XXXXX	XX	-	
Elementi in traccia	Ag	(x)	-	-	-	-	-	-	-	-
	Al	X	X	X	X	-	XX	X	-	(x)
	As	X	-	X	-	-	-	X	X	XX(x)
	Ba	X	-	-	-	-	-	X	-	-
	Be	X	-	-	-	-	-	X	-	-
	Cd	XX	-	X	-	-	-	X	XX	XXX
	Co	X	-	-	-	-	-	X	X	XX
	Cr	XX	-	-	-	-	-	X	X	XX
	Cr III/VI	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Cu	XX	-	X	-	X	-	X	XX	XXX
	Fe	X	-	X	-	-	-	X	X	XX
	Hg	-	X	-	X	-	-	-	-	X
	La	-	-	-	-	(x)	-	-	-	-
	Li	X(x)	-	-	-	-	-	-	-	-
	Mn	X	-	X	-	X	-	X	X	XX
	Mo	X	-	-	-	-	-	X	(x)	XXX
	Ni	XX	-	-	-	X	-	X	XX	XXX
	Pb	XX	-	X	-	X	-	X	X	XXX
	Sb	X	-	-	-	X	-	X	-	-
	Se	X	-	-	-	X	-	-	-	X(x)
	Sr	X	-	-	-	-	-	(x)	-	-
	Ti	(x)	-	-	-	-	-	-	-	-
	V	X	-	-	-		-	X	-	(x)
	Zn	XX	-	-	-		-	X	X	XXX

8.1.2 Materiali di riferimento non certificati – carte di controllo

Una carta di controllo è un semplice grafico, in cui vengono riportati in funzione del tempo i risultati ottenuti per l'analisi di un campione di riferimento di controllo di qualità, o più semplicemente campione di CQ; tale carta consente quindi il monitoraggio continuo dei risultati. La fluttuazione naturale dei valori misurati può così essere immediatamente valutata ed interpretata. Come campione di controllo viene in genere utilizzato un materiale di riferimento non certificato.
Esistono varie carte di controllo tra cui la Carta di Shewhart, il grafico a media mobile o il grafico CUSUM (CUmulative SUM o totale cumulato).
La carta di controllo di qualità (CQ) comunemente più utilizzata per il monitoraggio delle fluttuazioni nel breve termine è il grafico di Shewhart, in cui vengono riportati i risultati relativi ad un campione di riferimento per CQ.
Tale campione è un campione simile a quelli normalmente sottoposti ad analisi, che presenti una certa omogeneità e stabilità nel tempo e che sia disponibile in grandi quantità. È ragionevole presumere che se la variazione dei risultati relativi al campione di CQ è accettabile, lo siano anche le variazioni associate ai risultati ottenuti parallelamente per i campioni reali analizzati negli stessi lotti. Il campione di CQ viene inizialmente sottoposto ad un numero di analisi sufficiente per determinare il valore medio e lo scarto tipo e preparare la carta di controllo.
L'insieme dei risultati o popolazione, quando in numero statisticamente rilevante, ha un valo-

re medio o media, nell'intorno della quale i valori sono in genere distribuiti simmetricamente secondo una distribuzione normale o gaussiana. È generalmente pratica comune sottoporre il campione di CQ ad almeno 10 analisi effettuate possibilmente in giorni differenti. La distribuzione dei valori intorno alla media, generalmente considerata come valore di riferimento o aspettato, è statisticamente regolato dallo scarto tipo; il 95% della popolazione è sempre compreso nell'intervallo definito dalla media ± 2 volte lo scarto tipo, mentre il 99,7% della popolazione è sempre compreso nell'intervallo definito dalla media ± 3 volte lo scarto tipo. Questi valori rappresentano i limiti da riportare graficamente: solitamente i valori (media ± 2 x scarto tipo) corrispondono ai limiti di guardia, mentre i valori (media ± 3 x scarto tipo) corrispondono ai limiti di intervento.
Ogni ulteriore misura deve soddisfare i precedenti limiti.
Il grafico della carta di controllo è in grado di evidenziare variazioni nel sistema di misura che comportino uno spostamento della media o un aumento dello scarto tipo.
La norma ISO 8258:1991 costituisce una guida in cui sono specificati con accuratezza i casi di comportamento anomalo del sistema di analisi. I tre casi principali sono sotto elencati:

- tre punti successivi oltre i limiti di guardia ma entro i limiti di intervento;
- due punti successivi oltre i limiti di guardia ma entro i limiti di intervento sullo stesso lato della media;
- un punto oltre il limite di intervento;
- dieci punti successivi sullo stesso lato della media.

Nel caso in cui si verifichi un tale evento si deve controllare il sistema di analisi prima di proseguire con le analisi. Una volta riportato il sistema sotto controllo si ricostruisce la carta di controllo ripetendo almeno 10 volte l'analisi del campione di CQ.
Dalla Fig. 4a alla Fig. 4d si possono osservare esempi di Carte di Shewhart, in cui sono riportate varie tipologie di risultati.

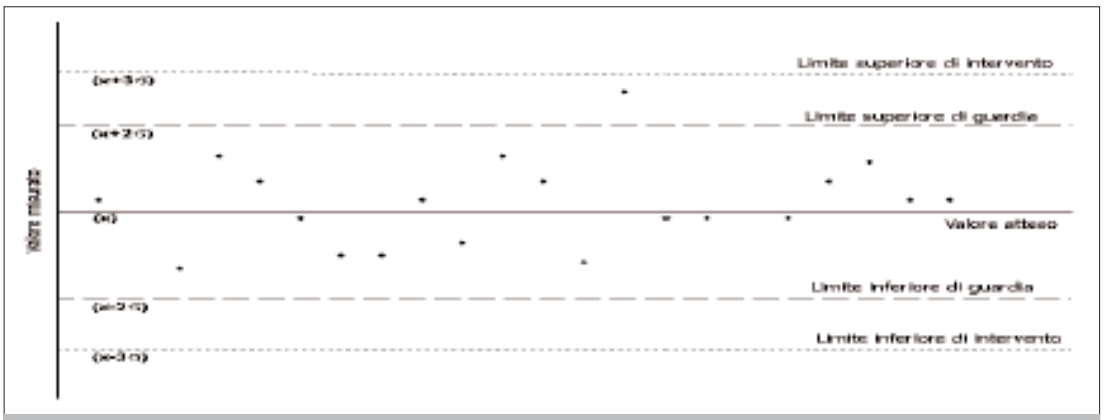


Figura 4a: Carta di Shewhart con dati sotto controllo intorno al valore di riferimento.

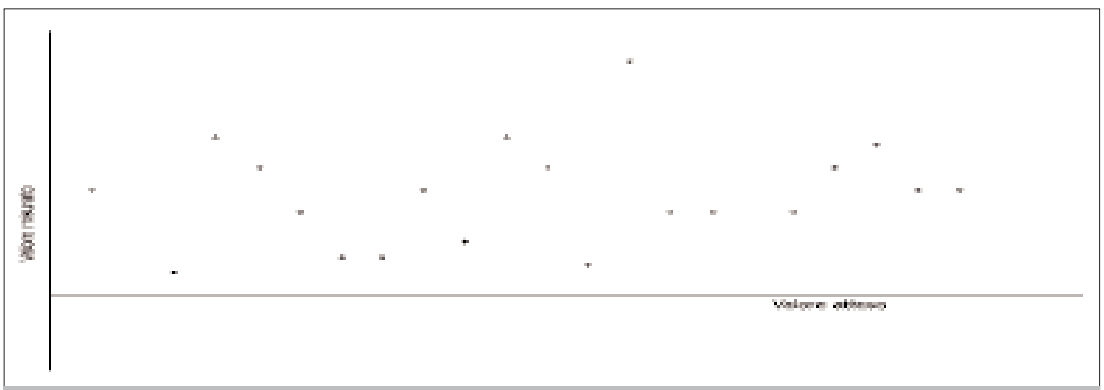


Figura 4b: Carta di Shewhart con dati decentrati rispetto al valore di riferimento.

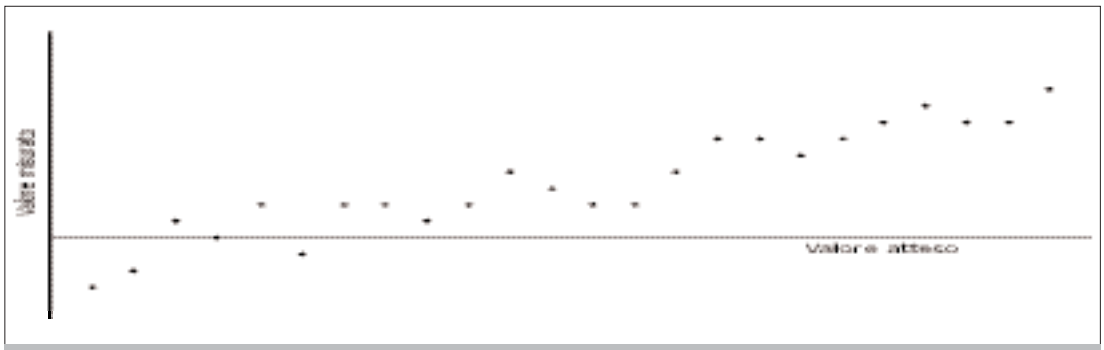


Figura 4c: Carta di Shewhart con dati soggetti a deriva.

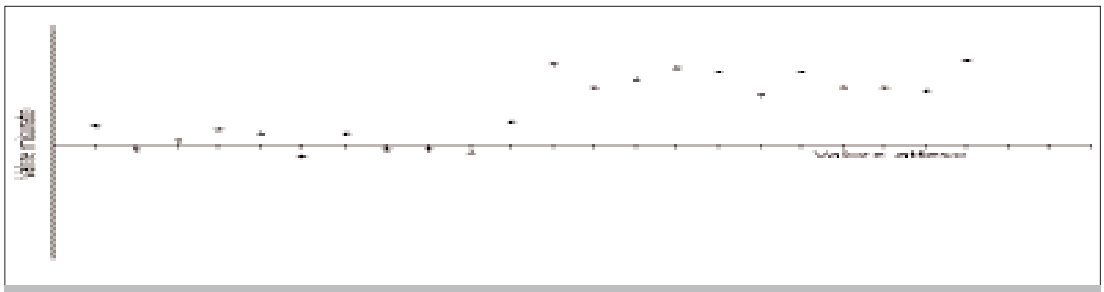


Figura 4d: Carta di Shewhart con dati soggetti ad una variazione a gradino.

Un limite della carta di Shewhart è che non consente l'immediata visualizzazione di variazioni progressive o a gradino; queste possono invece essere messe in evidenza mediante una carta a media mobile in cui la variazione naturale viene mediata prima della sua rappresentazione grafica, in modo tale che emergano solo le variazioni significative. Esso normalmente media quattro valori in successione, ma il numero *n* dei valori mediati può essere liberamente scelto a seconda delle esigenze. A valori maggiori di *n* corrisponde un maggiore effetto di smussamento sui dati ma anche un maggiore tempo di risposta nell'identificazione delle variazioni significative.
Esempio di grafico a media mobile con valori mediati a base 4 (n=4):
Misure:

1,2,3 e 4 mediate e riportate come 1° punto
2,3,4 e 5 mediate e riportate come 2° punto
3,4,5 e 6 mediate e riportate come 3° punto
4,5,6 e 7 mediate e riportate come 4° punto
5,6,7 e 8 mediate e riportate come 5° punto, e così via

In Fig. 5 sono riportati su una carta a media mobile (n=4) gli stessi dati precedentemente riportati in Fig. 4d. In Fig. 5 risulta molto più evidenziata la variazione a gradino rispetto alla variazione di fondo.
Anche la carta di Shewhart può essere utilizzata per riportare le medie di misure, a condizione che ciascun punto rappresenti la media di un uguale numero di misure. Come per la carta a media mobile, si conferisce in questa maniera una maggiore uniformità al sistema eliminando alcune delle variazioni casuali dei dati. In questo caso occorre però modificare i limiti di guardia e di intervento; infatti effettuando una media su *n* misure prima di tracciare il grafico si riduce lo scarto tipo di $\sqrt{n}$; di conseguenza i limiti di intervento e di azione devono essere definiti, rispettivamente, a $\pm 3/\sqrt{n}$ e $\pm 2/\sqrt{n}$ unità di scarto tipo.
Un altro tipo di grafico di controllo è il grafico CUSUM, in cui vengono riportati i valori medi di tutti i dati, ed è quindi il metodo migliore per identificare piccole variazioni nella media. Per ciascuna nuova misura si calcola la differenza fra essa ed il valore di riferimento T e la si somma ad un totale corrente (somma cumulativa). Questo totale cumulato viene riportato graficamente contro il numero delle misure (CUSUM sta appunto per CUmulative SUM, ossia totale cumulato).

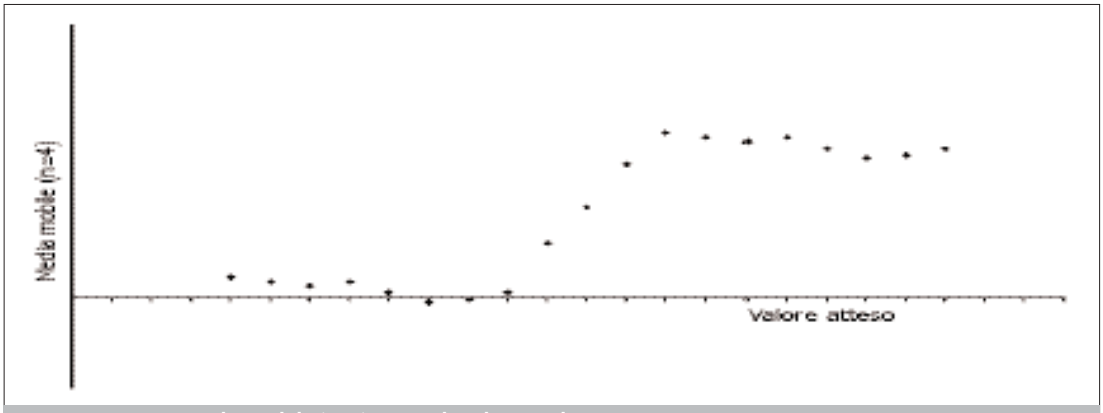


Figura 5: Carta a media mobile (n=4): stessi dati di Fig. 4d.

Quanto più la media operativa è vicina al valore di riferimento T, tanto più il gradiente del grafico CUSUM sarà prossimo allo zero. Un gradiente positivo indica una deviazione positiva della media operativa, mentre un gradiente negativo indica il contrario. In Figg. 6a e 6b sono riportati due esempi di grafici CUSUM; nel primo si evidenzia un'improvvisa variazione del gradiente dovuta ad una variazione a gradino dei risultati, mentre nel secondo viene evidenziato un gradiente in costante cambiamento dovuto a continue variazioni della media di piccola entità.

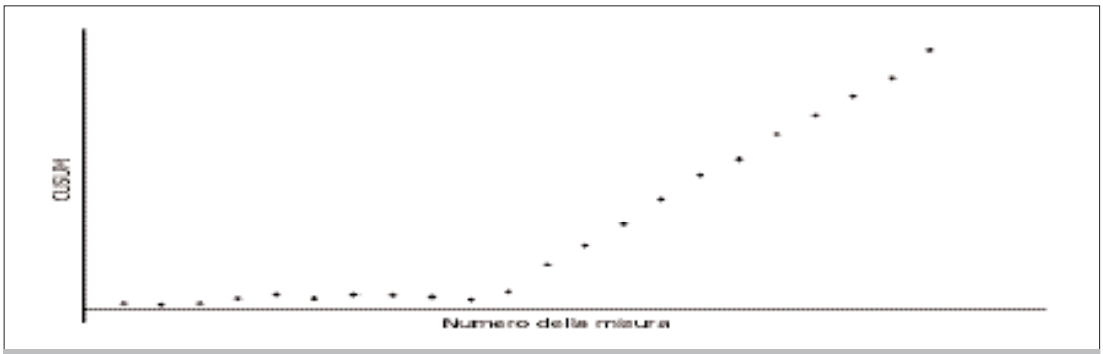


Figura 6a: Variazione a gradino mostrata come carta CUSUM.

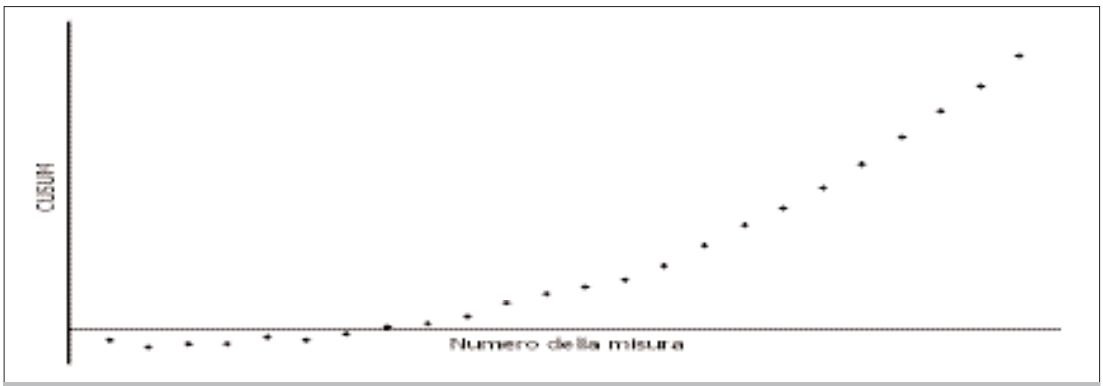


Figura 6b: Carta CUSUM di dati alla deriva.

Per verificare se i dati rappresentati su una carta CUSUM sono sotto controllo, si utilizza una maschera a 'V', solitamente realizzata in materiale trasparente, in modo da poter essere sovrapposta alla carta stessa. La Fig. 6c mostra un diagramma della maschera a V. I limiti di controllo sono definiti dalla lunghezza di β e dall'angolo θ, che possono essere scelti in modo che la maschera offra la stessa probabilità statistica di controllo dei limiti di intervento/guardia tradizionali, conferendo al grafico di CUSUM una corrispondenza con la carta Shewhart.

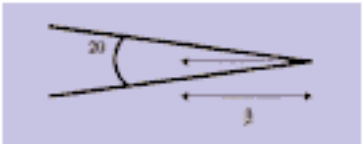


Figura 6c: La maschera a V per l'interpretazione di carte CUSUM.

I dati sulla carta CUSUM vengono esaminati appoggiando la maschera sui dati, con l'estremità sinistra della freccia β allineata di volta in volta a ciascun punto. La linea β è sempre mantenuta parallela all'asse *x*. Se i punti corrispondenti ai dati precedenti rientrano nei bracci della maschera, il sistema è sotto controllo. Quando essi cadono esternamente ai bracci della maschera, il sistema è fuori controllo. La Fig. 6d illustra l'uso di una maschera a V, posizionata su due posizioni diverse, su dati CUSUM soggetti a deriva. Al punto A della Fig. 6d tutti i dati precedenti rientrano visibilmente nei bracci della maschera ed il sistema è sotto controllo, mentre al punto B alcuni dei dati precedenti si trovano al di sotto del braccio inferiore della maschera, indicando che il sistema è fuori controllo.
Pertanto, i limiti di controllo sono definiti dalla lunghezza di β e dall'angolo θ, e devono quindi essere scelti con attenzione. Le scale impiegate sugli assi *x* e *y* hanno anch'esse un'influenza evidente sulla scelta di β e di θ.

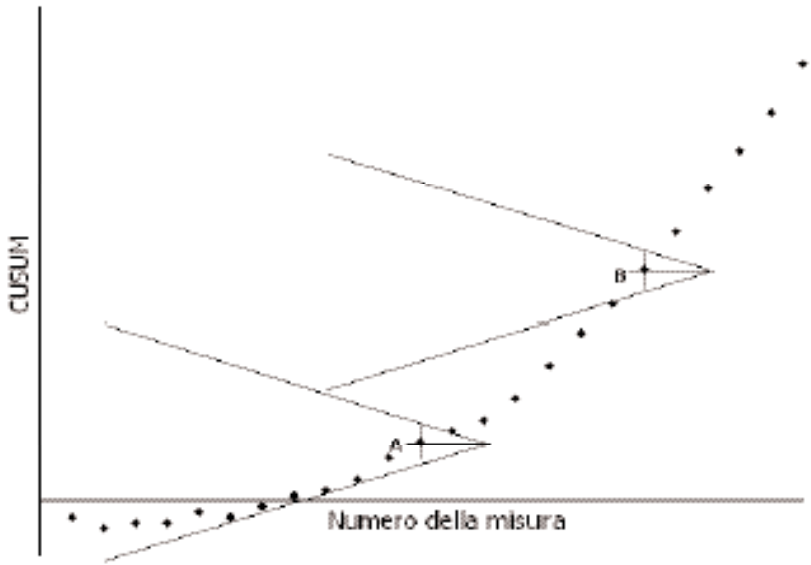


Figura 6d: Carta CUSUM che illustra l'uso di una maschera a V.

8.2 Studi interlaboratorio

Gli studi interlaboratorio sono un utile strumento che può essere impiegato con le seguenti finalità distinte:

- valutare la confrontabilità dei dati ottenuti da più laboratori;
- valutare la riproducibilità di un metodo (studi di collaborazione).

I campioni da analizzare negli studi interlaboratorio devono essere materiali caratterizzati da elevata omogeneità e stabilità nel tempo; queste caratteristiche sono per definizione soddisfatte da materiali di riferimento non certificati, ma in taluni casi possono essere utilizzati anche materiali, cosiddetti "home-made", non di riferimento, preparati e distribuiti da un laboratorio partecipante.
Un laboratorio centrale si occupa di raccogliere ed elaborare i dati relativi all'analisi del cam-

pione distribuito a tutti i laboratori. Momento fondamentale negli studi interlaboratorio sono le riunioni in cui i partecipanti confrontano e discutono i propri risultati.
Uno studio in collaborazione è una forma particolare di studio in comune tra diversi laboratori, con cui si valutano le prestazioni di un metodo prestabilito. Tale tipo di studio è indicato per lo sviluppo di metodi di analisi di riferimento. Un laboratorio funge da coordinatore e si occupa di proporre ai partecipanti un protocollo di analisi dettagliato, aperto ad eventuali modifiche da concordare tra tutti i partecipanti. I campioni distribuiti devono quindi essere analizzati da tutti i partecipanti secondo un protocollo definitivo ed i dati ottenuti elaborati dal laboratorio coordinatore e discussi da tutti i partecipanti. Al termine dello studio, che potrebbe prevedere la ripetizione delle analisi modificando il metodo a fronte dei risultati ottenuti, viene stesa una proposta di metodo da parte del coordinatore in accordo con i partecipanti.
La partecipazione a tali studi è utile anche per individuare errori sistematici.
In generale, oltre ai contributi all'incertezza derivanti dal campionamento e dalla conservazione del campione, possono essere individuate tre fonti di incertezze:

- il trattamento del campione (p.es. estrazione, digestione, derivatizzazione, purificazione);
- l'analisi finale (p.es. errori di taratura, interferenze spettrali, sovrapposizione di picchi);
- la professionalità degli addetti e le strutture del laboratorio.

Durante gli studi interlaboratorio, differenti metodi di pre-trattamento ed analisi vengono confrontati e valutati. Se i risultati sono in buon accordo statistico, il valore medio ottenuto è la migliore approssimazione del valore "vero".

9. Glossario

Accuratezza
Grado di concordanza tra il risultato di una misurazione e il valore "vero" del misurando (UNI CEI ENV 13005, 2000).

Bianchi
La loro determinazione consente di stabilire quale parte della misura non dipenda dall'analita contenuto nel campione. Si distinguono vari tipi di bianchi; tra questi:

- Bianco reagenti: tiene conto della contaminazione derivante dai reagenti. Vengono effettuati controlli analitici sui reagenti onde escludere o almeno quantificare eventuali contaminazioni.
- Bianco di procedura: tiene conto della contaminazione derivante dai reagenti e dalle apparecchiature e strumentazioni utilizzate. Viene effettuata una procedura d'analisi completa eseguita in assenza del campione.
- Bianco matrice: tiene conto delle interferenze provenienti dalla matrice. In teoria viene analizzata una matrice identica al campione in cui l'analita è contenuto in quantità inferiore al limite di rivelabilità del metodo. In pratica tale matrice è quasi impossibile da reperire e si cerca di utilizzare matrici quanto più simili possibile a quelle di interesse.

Esattezza
Grado di concordanza tra la media dei risultati di un gran numero di misure e un valore di riferimento accettato (ISO 5725/1).

Garanzia di Qualità dell'Analisi (GAQ)
Complesso delle azioni codificate che vengono ripetute sistematicamente per fornire un'adeguata sicurezza alla qualità delle operazioni adottate per l'ottenimento di una misura.

Incertezza
Si distinguono tre tipi di incertezze.
Incertezza tipo
Rappresenta l'incertezza del risultato di una misurazione espressa come scarto tipo.
Incertezza tipo combinata
Rappresenta l'incertezza tipo del risultato quando il risultato è ottenuto dai valori di un certo numero di altre grandezze. È uguale alla radice quadrata di una somma di termini che comprendono varianze e covarianze di queste grandezze pesate a seconda di come il risultato della misurazione varia al variare di esse.
Incertezza estesa
Rappresenta l'intervallo intorno al risultato di una misurazione che si stima possa comprendere una gran parte della distribuzione dei valori ragionevolmente attribuiti al misurando.

Limite di rivelabilità strumentale
Il limite di rivelabilità strumentale rappresenta il valore limite di concentrazione che produce un segnale più grande di cinque volte rispetto al rapporto segnale/rumore dello strumento.

Limite di rivelabilità del metodo
Il limite di rivelabilità del metodo rappresenta il valore limite di una certa quantità che è possibile distinguere significativamente dal valore del bianco di procedura. In pratica esso viene valutato mediante la formula

$$L_R = x_b + 3\sigma_b$$

dove x_b è il valore medio del bianco e σ_b la precisione della sua misura.

Materiale di riferimento (RM)
Materiale o sostanza i cui valori di una o più proprietà sono sufficientemente omogenei e ben stabiliti da essere impiegati nella taratura di uno strumento, per la valutazione di un metodo di misurazione, o per l'assegnazione di valori a materiali.

Materiale di riferimento certificato (CRM)
Materiale di riferimento, accompagnato da un certificato, i cui valori di una o più proprietà sono certificati da un procedimento che stabilisce la riferibilità ad una accurata realizzazione dell'unità nella quale i valori delle proprietà sono espressi e per cui ciascun valore certificato è accompagnato da un'incertezza con un livello di fiducia stabilito.

Precisione
Misura del grado di dispersione di una serie di dati prodotti da repliche indipendenti intorno ad un valore centrale.

Riferibilità
La riferibilità rappresenta la proprietà di un risultato di una misurazione per la quale esso può essere posto in relazione con riferimenti definiti, nazionali o internazionali, attraverso una catena ininterrotta di confronti aventi tutti incertezze note.

Taratura
Serie di operazioni che stabiliscono, sotto precise condizioni, la relazione tra i valori indicati dallo strumento ed i corrispondenti valori noti del sistema internazionale di misura (SI).

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard methods for the examination of water and wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA), 1-1/1-26.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (1981): *"Annual Book of ASTM Standards"*, Part 31, Water (Philadelphia).

BARBIZZI S., de ZORZI P., GALAS C. (2002): *"Metrologia e conduzione del campionamento ambientale"*, *Tutto Misure*, Augusta-Edizioni Mortarino, n. 01, anno IV.

CHEESEMAN R.V. & WILSON A.L. (1989): *"A manual on analytical quality control for the water industry"*, WRC.

EURACHEM/CITAC Guide (2000): *"Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement"*. Laboratory of Government Chemist, London.

GARFIELD F.M. (1993): *"Quality Assurance Principles for Analytical Laboratories"*, 2nd Ed., AOAC International, Gaithersburg MD, USA.

International Vocabulary of Basic and General Terms in Metrology (VIM; 1993): BIPM, IEC, IFCC, ISO, IUPAC, IUPAP AND OIML.

ISO 8258 (1991): *"Shewhart control charts"*.

ISO 5725-1 (1994): *"Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results"*- Part 1: General principles and definitions.

ISO GUIDE 30 (1992): *"Terms and definitions used in connection with reference materials"*.

ISO GUIDE 32 (1997): *"Calibration in analytical chemistry and use of certified reference materials"*.

ISO GUIDE 33 (2000): *"Uses of certified reference materials"*.

ISO GUIDE 34 (2000): *"General requirements for the competence of reference material producers"*.

KRAMER KEES J.M. (1998): "Perspective – Inorganic Certified Reference Materials in Water: What do we have, what do we need?", *Analyst*, **123**, 991-995.

PRICHARD E. (1995): *"Quality in the Analytical Chemistry Laboratory"*, John Wiley & Sons, Ltd.

QUEVAUVILLER P.H. (1994): *"Quality Assurance for Water Analysis"*, Trends in Analytical Chemistry, **13** (9), 404-409.

UNI CEI EN ISO/IEC 17025 (2000): *"Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura"*, Milano.

UNI CEI ENV 13005 (2000): *"Guida all'espressione dell'incertezza di misura"*, Milano.

UNICHIM (1999): *"Linee guida per la validazione di metodi analitici nei laboratori chimici"*. Criteri generali, Manuale N. 179/0, Milano.

VALCÀRCEL M. & RÌOS A. (1999): *"Reliability of Analytical Information in the XXIst century"*, *Anal. Chim. Acta*, **400**, 425-432.

YOUDEN, W.J. & STEINER E.H. (1975): *"Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists"*, (Arlington, VA).

2000 - PARAMETRI FISICI, CHIMICI E CHIMICO-FISICI

Questa parte prevede in primo luogo misure di parametri caratteristici delle proprietà fisiche, chimiche e chimico-fisiche di un campione. Alcune di queste misure, come ad esempio il colore, la conducibilità, la torbidità, l'odore, il sapore, sono basate su caratteristiche fisiche, le cui interrelazioni con la composizione chimica sono evidenti anche quando non possono essere espresse analiticamente. Altre misure, come ad esempio l'acidità e alcalinità, il pH e la durezza sono basate su "test" chimici o chimico-fisici.

2010. Acidità e alcalinità

L'acidità totale è la somma dell'acidità forte (acidi completamente dissociati) e dell'acidità debole (acidi parzialmente dissociati) e misura la capacità di un'acqua di neutralizzare le basi forti. Acidi minerali forti (acido solforico, nitrico, cloridrico), acidi deboli (es. acido acetico e carbonico), sali come solfati di ferro e alluminio che danno luogo ad idrolisi acida contribuiscono alla misura dell'acidità, che dipende dal pH scelto come punto finale della titolazione. Nella maggior parte delle acque l'acidità forte corrisponde all'attività dello ione idrogeno e può essere calcolata dal pH.
Gli acidi contribuiscono alla corrosività di un'acqua ed influenzano la velocità delle reazioni chimiche, la speciazione e i processi biologici.
L'alcalinità totale di un'acqua rappresenta la sua capacità di neutralizzare gli acidi ed è la somma di tutte le basi titolabili da un acido. L'alcalinità di un'acqua naturale avente un pH inferiore a 8,5 dipende principalmente dal contenuto di bicarbonati, mentre a pH superiori rappresenta il contenuto di bicarbonati, carbonati ed idrossidi; anche altre basi, come borati, fosfati, silicati, ammoniaca, contribuiscono, se presenti, alla misura dell'alcalinità.

ACIDITÀ

1. Principio del metodo

Il metodo è limitato alla determinazione dell'acidità forte e consiste nel titolare un campione dell'acqua in esame con una soluzione di riferimento di base forte. Il punto finale della titolazione è fissato a pH 3,7, punto di viraggio dell'indicatore al metilarancio.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ad acque naturali e di scarico.

3. Interferenze e cause di errore

La determinazione titrimetrica mediante indicatore non è applicabile se il campione è colorato. In questi casi, si può sempre operare controllando il pH della soluzione con un pHmetro ed arrestando la titolazione a pH 3,7.
Con l'aggiunta della base titolante si neutralizzano parzialmente anche acidi organici ed inorganici deboli eventualmente presenti.
La CO_2 eventualmente presente nella soluzione di norma non interferisce in quanto, all'equilibrio a pH 3,7, lo ione bicarbonato rappresenta una frazione molto bassa del carbonio inorganico totale presente. Di conseguenza, la formazione di HCO_3^- a spese della base titolante è trascurabile.
Il cloro libero esplica un'azione distruttrice sull'indicatore in ambiente acido. Una piccola aggiunta di tiosolfato sodico 0,1 M elimina questa interferenza.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il prelievo e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". Utilizzare recipienti di polietilene o vetro riempiti fino all'orlo e ben tappati. Analizzare i campioni immediatamente o conservarli a 4°C al massimo per 24 ore.

5. Apparecchiature

5.1 Normale attrezzatura di laboratorio

5.2 Burette da 50, 25 e 10 mL

6. Reattivi

Tutti i reattivi utilizzati devono essere puri per analisi e l'acqua deionizzata, priva di CO_2 (*), deve avere un pH≥6 a 25°C.

6.1 Soluzione di riferimento di NaOH 0,1 N

Si consiglia di utilizzare soluzioni a titolo noto disponibili in commercio. In alternativa, sciogliere 4,0 g di NaOH in acqua deionizzata priva di CO_2 e portare a volume a 1000 mL. Conservare la soluzione in bottiglie di polietilene, proteggendola dal contatto dell'aria con un tubo a calce sodata. La soluzione di NaOH di riferimento viene preparata titolandola con una soluzione di ftalato acido di potassio ($KHC_8H_4O_4$) 0,05 N, preparata sciogliendo 10 g di $KHC_8H_4O_4$, previamente essiccato a 120°C, in acqua e portando a volume a 1000 mL con acqua.

6.2 Soluzione di riferimento di NaOH 0,02 N

Trasferire 200 mL di soluzione (6.1) in matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua deionizzata priva di CO_2. Conservare la soluzione in bottiglie di polietilene, proteggendola dal contatto dell'aria con un tubo a calce sodata. La soluzione di NaOH di riferimento viene preparata titolandola con una soluzione di ftalato acido di potassio ($KHC_8H_4O_4$) 0,05 N.

6.3 Indicatore al metilarancio

Sciogliere 0,1 g del sale sodico dell'acido dimetilamminoazobenzensolfonico (metilarancio) in 100 mL di acqua bollente, quindi raffreddare la soluzione. Prima dell'uso, filtrare attraverso un setto di vetro sinterizzato.

6.4. Soluzione di tiosolfato di sodio ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) 0,1 M

Sciogliere 25 g di $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ in acqua e portare a volume in matraccio tarato da 1000 mL.

7. Procedimento

Prelevare un volume noto V di campione in un beaker. Aggiungere 2 gocce di indicatore al metilarancio (6.3) e titolare con NaOH fino a viraggio dell'indicatore. Il volume di campione da sottoporre all'analisi e la normalità della soluzione di NaOH (0,1 o 0,02 N) andranno

(*) Si fa bollire l'acqua distillata per mezz'ora e la si fa raffreddare proteggendola con un tubo a calce sodata, ovvero facendovi gorgogliare azoto.

scelte opportunamente sulla base delll'acidità del campione. Ad esempio, per campioni aventi acidità inferiore a 1000 mg di $CaCO_3$/L utilizzare un volume contenente meno di 50 mg di $CaCO_3$ e titolare con NaOH 0,02 N (6.2); per campioni con acidità superiore a 1000 mg di $CaCO_3$/L utilizzare un volume contenente meno di 250 mg di $CaCO_3$ e titolare con NaOH 0,1 N (6.1).

8. Calcoli

L'acidità minerale viene ricavata dalla seguente relazione:

$$\text{Acidità } (\text{meq}\cdot\text{L}^{-1}) = \frac{a\cdot N\cdot 1000}{V}$$

in cui:
a = volume (mL) di soluzione di NaOH impiegato nella titolazione;
N = normalità della soluzione di NaOH;
V = volume (mL) di campione prelevato.

L'acidità, espressa come mg $CaCO_3$/L, si ricava moltiplicando per 50 (peso equivalente del $CaCO_3$) il risultato ottenuto dalla precedente relazione.

9. Qualità del dato

Le caratteristiche del campione in esame influiscono sensibilmente sulla precisione del metodo: la precisione connessa all'operazione di titolazione è probabilmente superiore a quella delle fasi di campionamento e manipolazione del campione.
Prove effettuate (n=5) da un singolo laboratorio su soluzioni sintetiche di acqua deionizzata, aventi un contenuto di acidità pari a 500 mg $CaCO_3$/L, hanno fornito un coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100 del 2,3%.

ALCALINITÀ

Il presente metodo riguarda la determinazione dell'alcalinità dovuta a basi forti. Esso consiste nel titolare un campione dell'acqua in esame con una soluzione di riferimento di un acido forte. Al fine di evidenziare il contenuto di basi forti in presenza di carbonati è necessario condurre la titolazione fino ai due successivi punti di equivalenza del bicarbonato e dell'acido carbonico. Tali punti di equivalenza possono essere individuati potenziometricamente tramite i due flessi che risultano dalla curva di titolazione, oppure osservando il viraggio di indicatori appropriati in accordo con le procedure A e B. È consigliabile seguire quest'ultima procedura solo nel caso in cui si debbano analizzare soluzioni prive di colore e torbidità o si vogliano acquisire informazioni preliminari sui livelli di alcalinità per scegliere opportunamente volume del campione e concentrazione del titolante da utilizzare nella procedura potenziometrica.

METODO A - Determinazione potenziometrica

1. Principio del metodo

Il campione è titolato direttamente aggiungendo volumi noti di soluzione di riferimento di acido e annotando, dopo ogni aggiunta, il valore del pH misurato con un pHmetro. I due punti di equivalenza possono essere identificati dai due flessi delle curve di titolazione o dai massimi ottenuti diagrammando le curve derivate.

Il diagramma della curva di titolazione tiene conto di qualunque spostamento del punto di equivalenza dovuto alla temperatura, alla forza ionica, ecc. Il metodo potenziometrico non subisce interferenza da parte del cloro residuo, è valido per soluzioni colorate e non è affetto dalle incertezze dovute all'operatore nell'apprezzamento del viraggio dell'indicatore.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ad acque naturali e di scarico.

3. Interferenze e cause di errore

Sostanze oleose, saponi, sospensioni solide interferiscono, ma non possono venir rimossi poichè possono essere responsabili della basicità del campione in esame. Analogamente, la formazione di un precipitato durante la titolazione o la presenza di ioni idrolizzabili, per esempio quelli di acidi organici o inorganici deboli, rendono molto lento il raggiungimento dell'equilibrio e possono portare a risultati errati.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il prelievo e la conservazione del campione debbono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". Analizzare i campioni immediatamente o conservarli a 4°C al massimo per 24 ore.

5. Apparecchiature

5.1 *Buretta da 50 mL* al decimo di millilitro.

5.2 *Beaker da 300 mL*

5.3 *pHmetro* con elettrodo di misura ed elettrodo di riferimento.

6. Reattivi

Tutti i reattivi usati devono essere prodotti puri per analisi, l'acqua usata per la preparazione delle soluzioni deve essere deionizzata, priva di CO_2 (*) e deve avere un pH compreso tra 6,2 e 7,2 a 25°C.

6.1 *Soluzione di carbonato di sodio (Na_2CO_3) 0,05 N*

Sciogliere in acqua 2,65 g di carbonato di sodio, previamente essiccato a 250°C per 4 ore per eliminare eventuali tracce di $NaHCO_3$, e portare a volume in matraccio tarato da 1000 mL.

6.2 *Soluzione di riferimento di acido cloridrico 0,1 N*

Si consiglia di utilizzare soluzioni a titolo noto disponibili in commercio. In alternativa, aggiungere 8,5 mL di HCl concentrato (d=1,19 g/mL) a 100 mL di acqua e diluire a un litro.

(*) Si fa bollire l'acqua distillata per mezz'ora e la si fa raffreddare proteggendola con un tubo a calce sodata, ovvero facendovi gorgogliare azoto.

6.3 Soluzione di riferimento di acido cloridrico 0,02 N

Diluire 200 mL della soluzione (6.2) a 1000 mL con acqua. Controllare il titolo della soluzione mediante titolazione potenziometrica, utilizzando come titolante la soluzione di Na_2CO_3 (6.1). In prossimità del punto di equivalenza, bollire la soluzione per allontanare la CO_2, successivamente raffreddare e continuare la titolazione fino a completamento della curva.

6.4 Soluzione di riferimento di acido solforico 0,1 N

Si consiglia di utilizzare soluzioni a titolo noto disponibili in commercio. In alternativa, aggiungere cautamente 2,8 mL di H_2SO_4 concentrato (d=1,84 g/mL) a 100 mL di acqua e diluire a un litro.

6.5 Soluzione di riferimento di acido solforico 0,02 N

Diluire 200 mL della soluzione (6.4) a 1000 mL con acqua. Controllare il titolo della soluzione mediante titolazione potenziometrica con Na_2CO_3 (6.1), seguendo le modalità descritte al Paragrafo 6.3.

7. Procedimento

Lavare accuratamente gli elettrodi del pHmetro (5.3) e un beaker (5.2) con acqua distillata; quindi asciugarli. Introdurre nel beaker un volume noto di campione (V). Aggiungere la soluzione titolante (6.3 o 6.5) da una buretta. Il volume di una singola aggiunta non deve superare 0,5 mL. Agitare la soluzione meccanicamente dopo ogni aggiunta; ad equilibrio raggiunto, leggere il pH e annotarlo.
Continuare la titolazione fino ad ottenere i dati necessari per costruire la curva di titolazione completa. Tracciare la curva di titolazione riportando i valori di pH letti o i valori calcolati dal rapporto $\Delta pH/\Delta v$, in funzione del volume progressivo di titolante aggiunto.

8. Calcoli

Detto a il volume (mL) di soluzione di riferimento di H_2SO_4 o HCl avente normalità N usato per raggiungere il primo punto di equivalenza (primo flesso della curva di titolazione) e b quello totale (incluso il volume a) necessario per il secondo punto di equivalenza (secondo flesso), ricavare i valori di P ("Alcalinità alla fenoftaleina") e T ("Alcalinità totale") con le seguenti formule:

1° punto di equivalenza $P(meq \cdot L^{-1}) = \frac{a \cdot N \cdot 1000}{V}$ (1)

2° punto di equivalenza $T(meq \cdot L^{-1}) = \frac{b \cdot N \cdot 1000}{V}$ (2)

in cui V rappresenta il volume (mL) di campione prelevato.

L'alcalinità totale, espressa come mg $CaCO_3$/L, si ricava moltiplicando per 50 (peso equivalente del $CaCO_3$) il risultato ottenuto dalla relazione (2).

Ricavati P e T (in meq/L) dalla titolazione del campione, l'alcalinità dovuta agli idrossidi si determina sulla base delle seguenti assunzioni:

- la presenza di bicarbonati esclude quella degli idrossidi nello stesso campione e viceversa;
- gli idrossidi sono presenti quando è P>1/2 T;

- i carbonati sono presenti quando è 0<P<1/2 T;
- i bicarbonati sono presenti se è P<1/2 T.

Se la curva di titolazione inizia a un pH inferiore a 8÷8,3, si avrà un solo flesso intorno a pH 4÷5. Di conseguenza sarà P=0, cioè sono presenti solo bicarbonati. D'altra parte, se è T=2P sono presenti solo carbonati.
In assenza di idrossidi P<1/2 T. Di conseguenza si ha:

HCO_3^- (meq·L^{-1}) = T - 2P

CO_3^{2-} (meq·L^{-1}) = 2P

Di conseguenza, una volta noti T e P, i diversi casi che possono presentarsi e le relative formule da applicare sono riportate nella tabella seguente:

Tabella 1: Modalità di calcolo dell'alcalinità una volta noti P e T

Risultato della titolazione	Idrossidi (meq/L)	Alcanilità equivalente a Carbonati (meq/L)	Bicarbonati (meq/L)
P=0	0	0	T
P<1/2 T	0	2P	T – 2P
P=1/2 T	0	2P	0
P>1/2 T	2P - T	2(T - P)	0
P=T	T	0	0

9. Qualità del dato

Le caratteristiche del campione in esame influiscono sensibilmente sulla precisione del metodo. La precisione connessa all'operazione di titolazione è probabilmente superiore a quella delle fasi di campionamento e manipolazione del campione.
Prove effettuate (n=5) da un singolo laboratorio su soluzioni sintetiche di acqua deionizzata, nell'intervallo 10-500 mg/L di alcalinità dovuta interamente a carbonati e bicarbonati, hanno fornito valori del coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio) · 100 compresi tra lo 0,2% e il 10% e un'esattezza compresa entro il 18%.

METODO B - Determinazione per titolazione con indicatore

1. Principio del metodo

La determinazione si basa sull'aggiunta di una quantità nota di un acido minerale diluito a un campione di acqua, fino ai due punti di equivalenza citati al metodo A evidenziati dal viraggio di indicatori appropriati.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ad acque naturali e di scarico.

3. Interferenze e cause di errore

Sono valide le considerazioni riportate per il Metodo A (Capitolo 3). Il metodo non è applicabile quando il campione è colorato oppure quando, durante la titolazione, si ha formazio-

ne di un precipitato che maschera il viraggio dell'indicatore; oppure quando sono presenti sostanze che distruggono l'indicatore. Fra queste ultime va ricordato il cloro residuo libero. Questa interferenza può, peraltro, essere eliminata con piccole aggiunte di tiosolfato di sodio.

4. Campionamento e conservazione del campione

Vedi Capitolo 4 metodo A.

5. Apparecchiature

5.1 *Buretta da 50 mL* al decimo di millilitro.

5.2 *Beaker da 250 mL*

6. Reattivi

Tutti i reattivi usati devono essere prodotti puri per analisi, l'acqua usata per la preparazione delle soluzioni deve essere deionizzata, priva di CO_2 (*) e deve avere un pH compreso tra 6,2 e 7,2 a 25°C.

6.1 Soluzione di carbonato di sodio (Na_2CO_3) 0,05 N

Sciogliere in acqua 2,65 g di carbonato di sodio, previamente essiccato a 250°C per 4 ore per eliminare eventuali tracce di $NaHCO_3$, e portare a volume in matraccio tarato da 1000 mL.

6.2 Soluzione di riferimento di acido cloridrico 0,1 N

Si consiglia di utilizzare soluzioni a titolo noto disponibili in commercio. In alternativa, aggiungere 8,5 mL di HCl concentrato (d=1,19 g/mL) a 100 mL di acqua e diluire a un litro.

6.3 Soluzione di riferimento di acido cloridrico 0,02 N

Diluire 200 mL della soluzione (6.2) a 1000 mL con acqua. Controllare il titolo della soluzione mediante titolazione con Na_2CO_3, utilizzando come indicatore una miscela di verde di bromocresolo (pK=4,5) e rosso metile (pK=5,5). In prossimità del punto di equivalenza far bollire la soluzione per allontanare la CO_2, successivamente raffreddare e continuare la titolazione fino a viraggio netto dell'indicatore.

6.4 Soluzione di riferimento di acido solforico 0,1 N

Si consiglia di utilizzare soluzioni a titolo noto disponibili in commercio. In alternativa, aggiungere cautamente 2,8 mL di H_2SO_4 concentrato (d=1,84 g/mL) a 100 mL di acqua e diluire a un litro.

6.5 Soluzione di riferimento di acido solforico 0,02 N

Diluire 200 mL della soluzione (6.4) a 1000 mL con acqua. Controllare il titolo della soluzione mediante titolazione Na_2CO_3 (6.1), seguendo le modalità descritte al Paragrafo 6.3.

(*) Si fa bollire l'acqua distillata per mezz'ora e la si fa raffreddare proteggendola con un tubo a calce sodata, ovvero facendovi gorgogliare azoto.

6.6 Indicatore misto verde di bromocresolo-rosso metile

Sciogliere 0,1 g di ciascuno dei due suddetti indicatori in 2,9 mL di NaOH 0,02 N, e portare a 100 mL con acqua distillata.

6.7 Indicatore alla fenolftaleina

Sciogliere 0,5 g di fenolftaleina in 50 mL di C_2H_5OH 95% e diluire a 100 mL con acqua distillata.

7. Procedimento

Trasferire un volume noto di campione in un beaker. Aggiungere 3-4 gocce di indicatore alla fenolftaleina (6.7) (il campione dovrebbe colorarsi in rosa) e titolare con HCl (o H_2SO_4) 0,02 N (6.3 o 6.5), fino a viraggio dell'indicatore. Annotare i mL di titolante consumati al punto di equivalenza.
Se, dopo aggiunta della fenolftaleina, il campione rimane incolore, aggiungere 3-4 gocce di indicatore misto (6.6) e titolare con HCl (o H_2SO_4) 0,02 N fino a viraggio dell'indicatore.

8. Calcoli

Applicare le formule già riportate al Capitolo 8 del Metodo A:

Punto di equivalenza alla fenolftaleina $P(meq \cdot L^{-1}) = \frac{a \cdot N \cdot 1000}{V}$ (1)

Punto di equivalenza all'indicatore misto $T(meq \cdot L^{-1}) = \frac{b \cdot N \cdot 1000}{V}$ (2)

in cui:
a = volume (mL) di titolante usato fino al viraggio della fenolftaleina;
b = volume (mL) di titolante usato fino al viraggio dell'indicatore misto (incluso il volume a);
N = normalità della soluzione titolante;
V = volume (mL) di campione prelevato.

L'alcalinità totale, espressa come mg $CaCO_3$/L, si ricava moltiplicando per 50 (peso equivalente del $CaCO_3$) il risultato ottenuto dalla relazione (2).

In assenza di idrossidi deve essere P<1/2 T; valgono le due relazioni (vedi metodo A Capitolo 8):

HCO_3^- $(meq \cdot L^{-1}) = T - 2P$

CO_3^{2-} $(meq \cdot L^{-1}) = 2P$

9. Qualità del dato

Vedi Metodo A Capitolo 9.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX ed., (Washington, APHA).

2020. Colore

Il colore di un'acqua è dovuto alla presenza di ioni metallici (ferro, manganese, rame), sostanze organiche (acidi umici e fulvici) e scarichi industriali. Il colore di un'acqua si riferisce al "colore vero", cioè al colore della luce trasmessa dopo eliminazione delle sostanze in sospensione, includendo fra queste le particelle pseudo-colloidali, per distinguerlo dal "colore apparente" a cui contribuiscono non solo le sostanze disciolte ma anche quelle in sospensione.
Nel seguito vengono riportati tre metodi per la determinazione del colore:

- metodo A (determinazione qualitativa), basato sul confronto visivo tra il campione in esame, eventualmente diluito con acqua distillata o deionizzata, e un campione di acqua distillata o deionizzata;
- metodo B (determinazione spettrofotometrica), basato sull'entità della luce trasmessa mediante uno spettrofotometro;
- metodo C (metodo al "platino-cobalto"), basato sul confronto visivo tra il campione in esame e soluzioni colorate a concentrazione nota.

METODO A – Determinazione qualitativa

1. Principio del metodo

L'intensità del colore viene determinata attraverso un confronto visivo fra il campione in esame - eventualmente diluito con acqua distillata o deionizzata - e un campione di acqua distillata o deionizzata.
L'osservazione dei campioni è effettuata attraverso uno spessore di 10 cm su fondo bianco.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile a qualunque tipo di acqua per ogni valore di intensità del colore.

3. Interferenze e cause d'errore

Torbidità, sospensioni o precipitati costituiscono cause di errore e debbono essere rimossi mediante centrifugazione prima dell'esame visivo dei campioni.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione debbono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".
Se non è possibile effettuare la determinazione subito dopo il prelievo, il campione deve essere conservato a 4°C in recipiente di vetro scuro, pulito e riempito completamente, per un ragionevole periodo di tempo. Le modificazioni di tipo biologico e fisico che si verificano durante la conservazione influenzano il colore.

5. Apparecchiature

5.1 Apparecchiatura per la valutazione visiva del colore costituita da:

5.1.1 Serie di cilindri in vetro ottico incolore a fondo piano e graduati con tacca di riferimento a 10 cm dalla base.

5.1.2 Supporto in legno per cilindri, opportunamente costruito e schermato lateralmente, per la valutazione visiva del colore dell'acqua per trasparenza su fondo bianco orizzontale (Fig. 1).

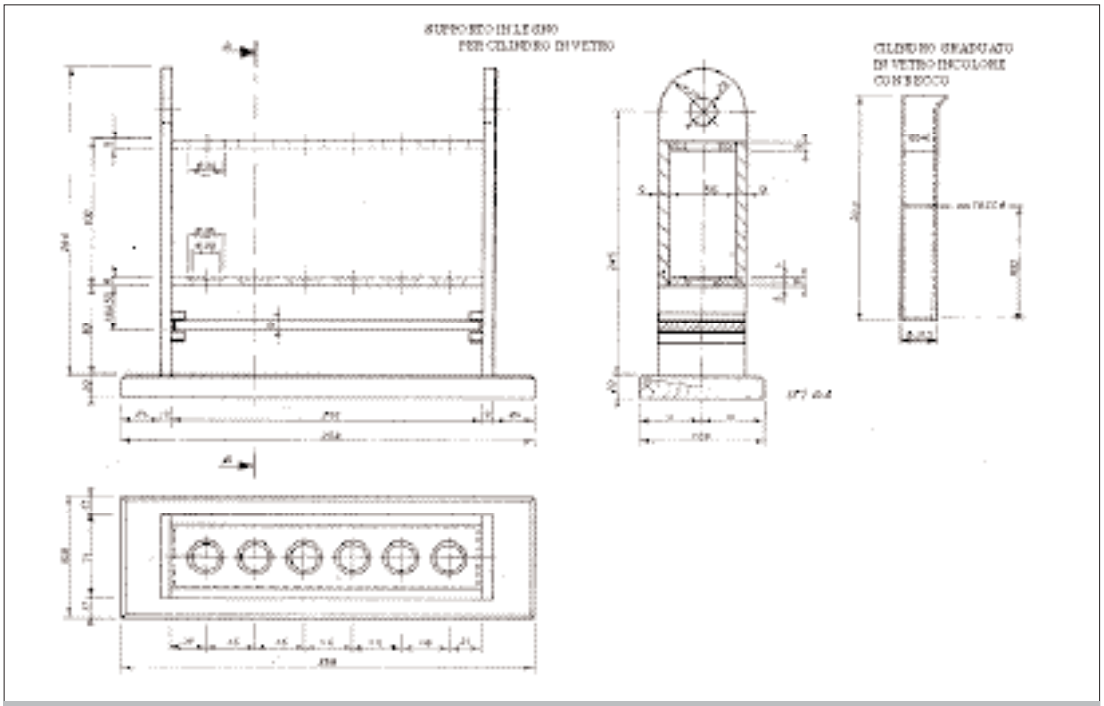


Figura 1: Esempio di apparecchiatura per la valutazione visiva del colore.

6. Reattivi

Deve essere impiegata acqua distillata o deionizzata.

7. Procedimento

Eliminare, se presenti, sospensioni, torbidità o precipitati, mediante centrifugazione. Preparare il campione e le soluzioni diluite del campione. Versare le soluzioni in uno dei cilindri di prova fino alla tacca a 10 cm dal fondo e osservare dall'alto verso il basso su una superficie bianca, in confronto con un analogo cilindro riempito con acqua fino alla tacca a 10 cm dal fondo.
Se la colorazione è percettibile la valutazione va effettuata con le soluzioni più diluite.
Nel caso in cui la determinazione sia finalizzata alla verifica dei limiti previsti dalla tabella 3 dell'allegato 5 del D.Lgs. 152/99, il campione in esame dovrà essere diluito con acqua distillata o deionizzata, rispettivamente nei rapporti 1:20 per acque di scarico che recapitano in acque superficiali ed 1:40 per acque di scarico che recapitano in pubblica fognatura.

8. Calcoli

Dall'esame comparativo fra il cilindro di riferimento contenente acqua e quelli contenenti le varie diluizioni, rilevare presenza o assenza di colore nel campione alla diluizione considerata nel metodo (1:10) o (1:20) o (1:40).

9. Qualità del dato

Per il principio stesso su cui si basa questo metodo non è possibile definire precisione e accuratezza.

METODO B – Determinazione spettrofotometrica

1. Principio del metodo

Il colore di un'acqua si riferisce al colore della luce trasmessa dopo eliminazione delle sostanze in sospensione, includendo fra queste le particelle pseudo-colloidali.
Il colore viene espresso in termini di sensazioni che si provano osservando l'acqua e che includono la lunghezza d'onda predominante (rosso, giallo, verde, ecc.), la luminosità e la purezza. Il valore di tali caratteristiche viene ricavato determinando l'entità della luce trasmessa mediante uno spettrofotometro. I dati di trasmittanza vengono convertiti in dati di classificazione cromatica usando riferimenti internazionali.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ad acque di scarico, superficiali e sotterranee.

3. Interferenze e cause di errore

Le sostanze in sospensione possono avere una notevole influenza sull'intensità della luce trasmessa e debbono essere eliminate mediante filtrazione del campione.

4. Campionamento e conservazione del campione

Vedi Capitolo 4 Metodo A.

5. Apparecchiature

5.1 *Spettrofotometro* utilizzabile tra 400 e 700 nm con una banda spettrale di 5 nm e celle aventi cammino ottico di 1 cm.

5.2 *Apparecchiatura per la filtrazione sotto vuoto*, con microfiltro metallico con pori del diametro medio di 40 micron (G3), come da Fig. 2. Le beute da vuoto sono da 250 mL.

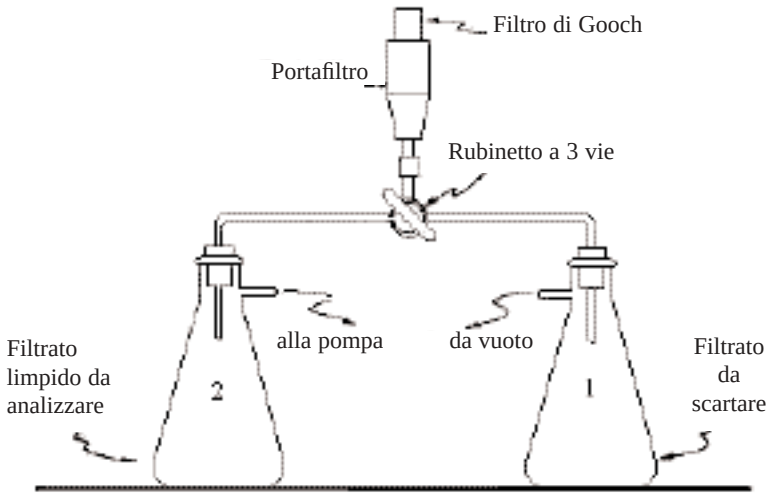


Figura 2: Apparecchio per la filtrazione sotto vuoto.

6. Reattivi

6.1 *Mezzo filtrante* per la chiarificazione del campione: farina fossile calcinata o celite.

6.2 *Acido solforico concentrato (d=1,84)*

6.3 *Idrossido di sodio*, soluzione al 30%.

7. Procedimento

Per la misura del colore prelevare 2 campioni da 50 mL dell'acqua in esame; lasciare inalterato il pH di un campione e correggere il pH dell'altro al valore di 7,6 aggiungendo volumi opportuni di una soluzione di H_2SO_4 o di NaOH in modo da non comportare significative variazioni di volume (>3%). La correzione del pH si rende necessaria in quanto il colore varia in funzione del pH. Effettuare su di essi una centrifugazione preliminare per eliminare l'eccesso delle sostanze in sospensione e trattare separatamente i due campioni nel modo seguente:

- miscelare un'aliquota di 10 mL di campione con 0,1 g del mezzo filtrante;
- filtrare, utilizzando il dispositivo descritto in Fig. 2, in modo da far depositare sul fondo del filtro uno strato continuo. Il liquido filtrato viene inviato nella beuta 1 (filtrato da scartare). Miscelare poi 0,04 g del mezzo filtrante con un'aliquota di 35 mL del campione centrifugato e filtrare raccogliendo il filtrato nella beuta 1.

Quando si comincia ad ottenere un filtrato limpido, ruotare il rubinetto a tre vie e raccoglierne 25 mL nella beuta 2 per la determinazione spettrofotometrica.
Misurare la trasmittanza, utilizzando celle da 1 cm preventivamente lavate con molta cura ed opportunamente risciacquate con il campione filtrato. Eseguire la misura alle lunghezze d'onda riportate in Tab. 1; qualora non si richiedano risultati molto accurati è sufficiente utilizzare i 10 valori di lunghezze d'onda segnati con asterisco.

Tabella 1: Lunghezze d'onda (nm) scelte per la determinazione del colore per via spettrofotometrica

Numero d'ordine	X	Y	Z
1	424,4	465,9	414,1
2*	435,5*	489,5*	422,2*
3	443,9	500,4	426,3
4	452,1	508,7	429,4
5*	461,2*	515,2*	432,0*
6	474,0	520,0	434,3
7	531,2	525,4	436,5
8*	544,3*	529,8*	438,6*
9	552,4	533,9	440,6
10	558,7	537,7	442,5
11*	564,1*	541,4*	444,4*
12	568,9	544,9	446,3
13	573,2	548,4	448,2
14*	577,4*	551,8*	450,1*
15	581,3	555,1	452,1
16	585,0	558,5	454,0
17*	588,7*	561,9	455,9*
18	592,4	565,3	457,9
19	596,0	568,9	459,9
20*	599,6*	572,5*	462,0*
21	603,3	576,4	464,1
22	607,0	580,4	466,3
23*	610,9*	584,8*	468,7*
24	615,0	589,6	471,4
25	619,4	594,8	474,3
26*	624,2*	600,8*	477,7*
27	629,8	607,7	481,8
28	636,6	616,1	487,2
29*	645,9*	627,3*	495,2*
30	663,0	647,4	511,2
Fattori moltiplicativi per			
30 lunghezze d'onda	0,03269	0,03333	0,03938
10 lunghezze d'onda	0,09806	0,10000	0,11814

8. Calcoli

Inserire, in ogni colonna di Tab. 1, il valore di trasmittanza percentuale corrispondente alla lunghezza d'onda indicata. Sommare i valori di trasmittanza delle rispettive colonne e moltiplicare tali somme per i rispettivi fattori indicati nella parte inferiore della tabella. I valori ottenuti vengono denominati X, Y, Z, rispettivamente. La quantità Y dà direttamente la luminosita' percentuale dell'acqua in esame. Le coordinate tricromatiche si ricavano dalle relazioni:

$$x = \frac{X}{X+Y+Z} \qquad y = \frac{Y}{X+Y+Z}$$

Localizzare il punto (x, y) sul diagramma cromatico (Fig. 3) e determinare la lunghezza d'onda dominante (in nm) e la purezza (in %) direttamente dal diagramma.
Le caratteristiche cromatiche dell'acqua (a pH 7,6 ed al pH originale) sono espresse in termini di lunghezza d'onda dominante (in nm, approssimata all'unità), di tonalità del colore (ad es. blu, blu-verde, ecc.) di luminosità (in %, approssimata al decimo) e di purezza (approssimata all'unità). Va specificato, inoltre, il tipo di spettrofotometro, il numero di lunghezze d'onda utilizzate (10 o 30) e l'ampiezza della banda spettrale (in nm).

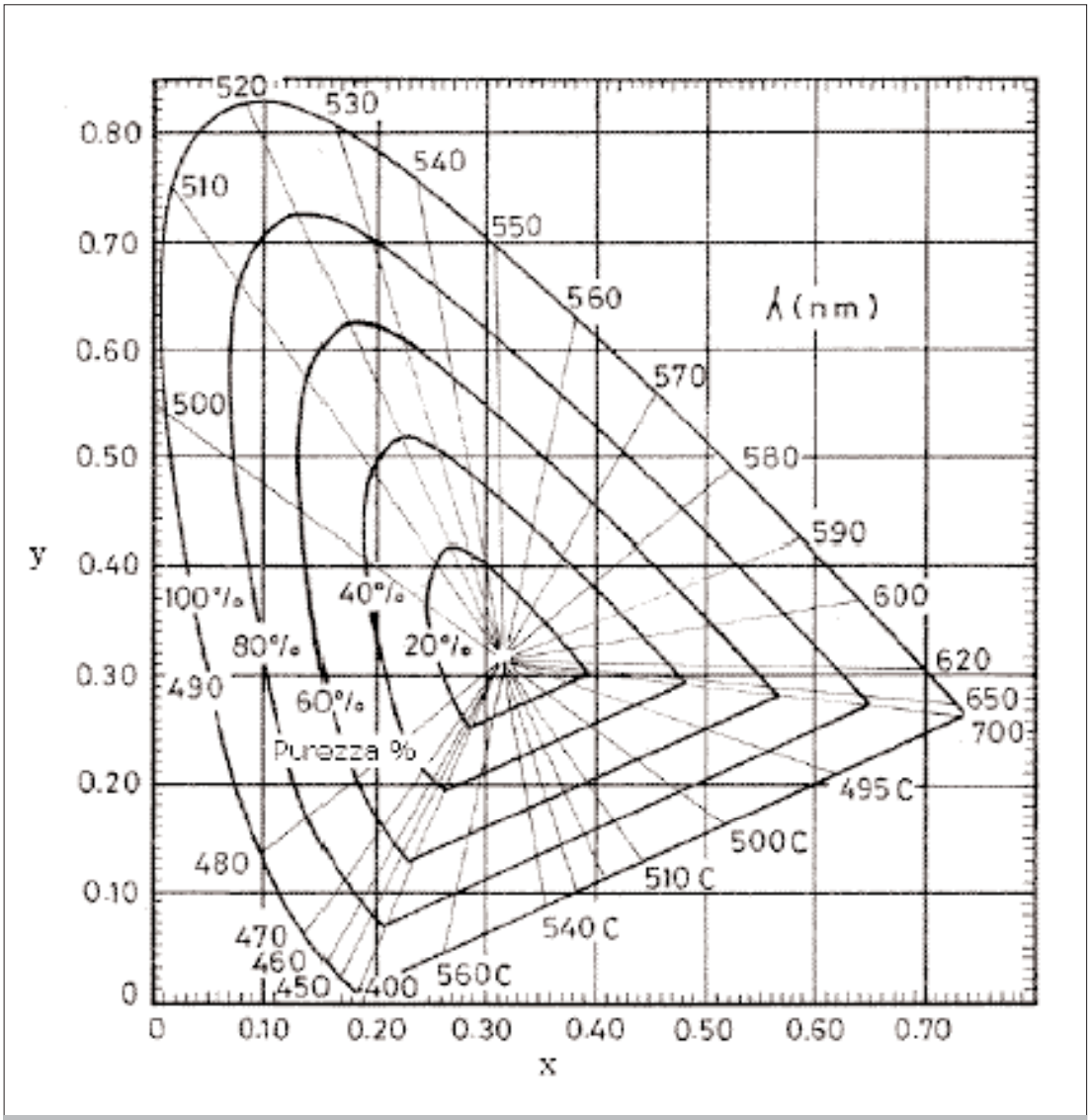


Figura 3: Diagramma cromatico.

Tabella 2: Tonalità del colore relativo ai campi di lunghezza d'onda dominanti

Campo di lunghezza d'onda dominante	(nm) Colore
400 - 465	Violetto
465 – 485	Blu
485 – 497	Blu–verde
497 - 530	Verde
530 – 575	Verde–giallo
575 – 580	Giallo
580 – 587	Giallo arancio
587 – 598	Arancio
598 – 620	Arancio–rosso
620 – 700	Rosso
400 – 530C*	Blu–porpora
530C – 700	Rosso–porpora

** Per il significato di 530C vedi Fig. 3.*

METODO C – Metodo al "platino- cobalto"

1. Principio del metodo

Il metodo si basa sul confronto visivo tra il campione in esame e soluzioni colorate a concentrazione nota. Si definisce 1 unità di colore (unità Hazen) quella prodotta da 1 mg Pt/L (esacloroplatinato) in presenza di 2 mg/L di cloruro di cobalto esaidrato.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile alle acque superficiali e sotterranee. Non è applicabile ad acque di scarico industriali molto colorate.

3. Interferenze e cause di errore

Vedi Capitolo 3 metodo A.

4. Campionamento e conservazione del campione

Vedi Capitolo 4 metodo A.

5. Apparecchiature

5.1 *Tubi colorimetrici* di Nessler da 50 mL.

6 Reattivi

6.1 *Acido cloridrico concentrato (d=1,19 g/mL)*

6.2 *Cloroplatinato di potassio (K_2PtCl_6)*

6.3 *Cloruro di cobalto esaidrato ($CoCl_2 \cdot 6H_2O$)*

6.4 *Soluzione di platino-cobalto*

Sciogliere 1,245 g di cloroplatinato potassico, pari a 0,500 g di platino metallico, ed 1,00 g di cloruro di cobalto esaidrato in 100 mL di acido cloridrico concentrato (d=1,19 g/mL). Diluire ad 1 litro con acqua distillata.
In mancanza di cloroplatinato si può usare l'acido cloroplatinico preparato nel modo seguente:

Sciogliere 0,500 g di platino puro in acqua regia; eliminare l'acido nitrico portando a secco varie volte la soluzione e riprendendola con acido cloridrico concentrato. Il residuo viene sciolto assieme ad 1 g di cloruro di cobalto secondo le modalità indicate in precedenza. L'acido cloroplatinico disponibile in commercio non è utilizzabile perchè igroscopico. A questa soluzione si attribuisce per convenzione un colore pari a 500 unità Hazen.

7. Procedimento

7.1 Taratura

Preparare le soluzioni di confronto in tubi di Nessler, diluendo 0,5 mL; 1,0 mL; 1,5 mL; 2,0 mL; 2,5 mL; 3,0 mL; 3,5 mL; 4,0 mL; 4,5 mL; 5,0 mL; 6,0 mL e 7,0 mL della soluzione di platino-cobalto (6.4) a 50 mL con acqua distillata, avendo cura che queste soluzioni non evaporino e non vengano contaminate. Si otterranno così colori pari a 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60 e 70 unità Hazen.

7.2 Dosaggio del campione

Se l'acqua presenta sostanze in sospensione è necessario eliminarle per centrifugazione. Le acque troppo colorate (colore superiore a 70 unità Hazen) vengono diluite opportunamente con acqua distillata tenendo conto della diluizione.
Riempire un tubo di Nessler con il campione nelle stesse condizioni della serie di tubi contenenti le soluzioni di confronto a diluizioni note. Paragonare il colore del campione in esame a quello delle soluzioni di confronto, guardando dall'alto verso il basso secondo l'asse del tubo, appoggiato su di una superficie bianca.

8. Calcoli

I risultati della determinazione del colore sono espressi in numeri interi (unità Hazen).
Quando il colore del campione esaminato è compreso tra due soluzioni di confronto, il risultato viene espresso nel modo seguente:

colore inferiore al numero Hazen della soluzione con intensità maggiore.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA), 2-1/2-6.

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ (1997): "*Metodi per le acque destinate al consumo umano*", Rapporti ISTISAN 97/8, 7-10.

RODIER J. (1966): "L'*analyse chimique et physico-chimique de l'eau*", (Dunod, Paris), 14.

UNICHIM (1975): "*Colore: metodo di valutazione visiva per diluizione*", Metodo Unichim Acque, 51, Milano.

2030. Conducibilità

Si definisce conducibilità elettrica (o conduttanza) di un mezzo omogeneo il reciproco della sua resistenza (espressa in ohm).
Per conducibilità elettrica specifica (o conduttività) si intende la conducibilità elettrica di un centimetro cubo di soluzione misurata, ad una determinata temperatura, fra due elettrodi a facce piane parallele aventi la superficie di 1 cm^2.

1. Principio del metodo

La determinazione della conducibilità elettrica specifica viene effettuata misurando la resistenza elettrica specifica di un campione acquoso mediante un ponte di Kohlrausch.
Le misure si dovrebbero eseguire a 25°C per evitare di adoperare correzioni per differenze di temperatura ed eliminare una delle maggiori fonti di errore. Si tenga presente che la conducibilità varia di circa il 2% per grado centigrado. La temperatura a cui si esegue la misura della conducibilità deve essere quindi specificata.
Periodicamente è necessario controllare il valore della costante di cella (*) utilizzando soluzioni di riferimento di KCl, i cui valori di conducibilità elettrica specifica sono noti (Tab. 1).

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile a campioni di acque superficiali e di scarico, sotterranee e di mare nell'intervallo previsto dallo strumento di misura.

(*) Si ricorda che la resistenza elettrica (R) di una sostanza omogenea, di lunghezza L e di sezione trasversale uniforme avente una superficie A è data dalla seconda legge di Ohm:

$$R = r\frac{L}{A}$$

dove con il termine r si intende la resistenza specifica o resistività.
Poiché per definizione la conducibilità (C) è l'inverso della resistenza si avrà:

$$C = \frac{1}{R} = \frac{1}{r}\cdot\frac{A}{L} = K\frac{A}{L}$$

ovvero:

$$K = \frac{CL}{A} = \frac{cm}{cm^2 \cdot ohm} = \frac{mho}{cm}$$

La costante K rappresenta la conducibilità specifica o conduttività. Questa costante, che ha valore caratteristico per ogni soluzione sotto determinate condizioni fisiche, come concentrazione, temperatura ecc., è numericamente uguale alla conducibilità di una colonna di elettrolita avente l'area della sezione trasversale pari a 1 cm^2 e la lunghezza pari ad 1 cm.
La conducibilità infine si esprime in ohm reciproci cioè ohm^{-1}. Si va sempre più diffondendo anche l'uso del termine "mho", che è sinonimo di ohm^{-1}. Moltiplicando il valore della conducibilità specifica, espressa in mho/cm, per 10^6 si ha la stessa espressa in micromho/cm (µmho/cm), o, che è lo stesso, in microsiemens/cm (µS/cm). L'uso di unità di misura precedute dal prefisso "micro" deriva dall'opportunità di esprimere la conducibilità specifica mediante un numero con pochi decimali piuttosto che con molti decimali.

3. Interferenze e cause di errore

La misura può venire alterata da sostanze oleose, grassi e sostanze particolari contenute nella soluzione, che possono depositarsi sulle superfici elettrodiche.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento va effettuato in contenitore di vetro o polietilene a chiusura ermetica, riempito completamente, in modo da preservarlo da possibili assorbimenti di acidi gassosi o di vapori di ammoniaca.
La misura va fatta nel minor tempo possibile dal prelievo o direttamente in campo; altrimenti il campione va conservato alla temperatura di 4°C al massimo per 24 ore. In quest'ultimo caso, prima dell'analisi, è necessario riportarlo alla temperatura originale o a quella prefissata di misura.

5. Apparecchiature

5.1 Vetreria normale di laboratorio

5.2 Misuratore di conducibilità specifica, corredato di cella di conducibilità con elettrodi platinati e di termostato o compensatore di temperatura.

6. Reattivi

6.1 Alcool etilico al 95% o alcool isopropilico o metilico

6.2 Acqua regia

Mescolare tre parti (in volume) di HCl (d=1,19 g/mL) e una parte (in volume) di HNO_3 (d=1,42 g/mL).

6.3 Soluzione platinante

Sciogliere 15 g di acido cloroplatinico ($H_2PtCl_6 \cdot 6H_2O$) in 50 mL di acqua contenente 0,0125 g di acetato di piombo [$Pb(C_2H_3O_2)_2$].

6.4 Etere etilico $(C_2H_5)_2O$

6.5 Cloruro di potassio (KCl), seccato in stufa a 105°C per due ore.

6.6 Soluzioni di riferimento per determinare la costante della cella.

6.6.1 Soluzione di riferimento di cloruro di potassio 0,1 N

Sciogliere 7,4365 g di KCl (6.5) in acqua bidistillata e diluire a 1 litro alla temperatura di 20°C (±2°C).

6.6.2 Soluzione di riferimento di cloruro di potassio 0,01 N

Sciogliere 0,7436 g di KCl (6.5) in acqua bidistillata e diluire a 1 litro.

6.6.3 Soluzione di riferimento di cloruro di potassio 0,001 N

Diluire a 1 litro, con acqua bidistillata, 100 mL della soluzione 6.6.2.

6.7 Acido cloridrico (HCl) 1:1

Diluire l'HCl concentrato (d=1,19 g/mL) con un uguale volume di acqua distillata.

7. Procedimento

7.1 Platinatura degli elettrodi

Viene eseguita su una cella nuova o quando gli elettrodi di una cella si siano deteriorati. Innanzi tutto procedere alla pulizia degli elettrodi con una soluzione costituita da 1 parte di alcool isopropilico (6.1), una di etere etilico (6.4) e 1 parte di HCl 1:1 (6.7).
Nei casi in cui si debba disciogliere tutto il nero di platino (deposito di platino finemente suddiviso che ricopre gli elettrodi in seguito alla platinatura) di una precedente platinatura ormai deteriorata, si ricorre all'uso dell'acqua regia (6.2).
Lavare con acqua e quindi procedere alla platinatura degli elettrodi con la soluzione platinante (6.3). Per effettuare la platinatura occorre una sorgente di corrente continua alla tensione di 6 V, una resistenza variabile, un milliamperometro ed un altro elettrodo costituito, per esempio, da un filo di Pt avvolto a spirale. Il deposito di nero di platino deve aderire bene alla superficie degli elettrodi.
Le condizioni in cui si effettua la platinatura non sono critiche, ma per ottenere buoni risultati conviene usare una densità di corrente da 1 a 4 $mA \cdot cm^{-2}$, in modo che complessivamente venga fornita una quantità di carica elettrica pari a 1,5÷3 $coulomb \cdot cm^{-2}$.

7.2 Controllo del valore della costante di cella

Sebbene per misure di routine si possa usare il valore riportato nel certificato di taratura che accompagna la cella stessa, per determinazioni più accurate conviene controllare tale valore, in quanto può subire variazioni in seguito ad alterazioni dello stato fisico degli elettrodi.
Per la verifica della costante di cella procedere nel modo seguente:

- portare la soluzione di riferimento di KCl scelta alla temperatura di 25°C mediante termostato;
- lavare accuratamente la cella di conducibilità con la soluzione di KCl;
- misurare la conducibilità in $\mu S \cdot cm^{-1}$.

Il nuovo valore della costante di cella (J_2) sarà:

$$J_2 = J_1 \frac{K_{st}}{K_r}$$

dove:
J_1 = valore della costante di cella riportato nel certificato di taratura;
K_{st} = conducibilità specifica ($\mu S \cdot cm^{-1}$) a 25°C della soluzione di riferimento di KCl come da Tab. 1;
K_r = conducibilità specifica ($\mu S \cdot cm^{-1}$) della soluzione di riferimento di KCl misurata sperimentalmente.

Tabella 1: Conducibilità specifica delle soluzioni di riferimento di KCl

Soluzione di riferimento	Normalità	Temperatura (°C)	Conducibilità specifica ($\mu S \cdot cm^{-1}$)
A	0,1	0	7138
	18	11167	
	25	12856	
B	0,01	0	773,6
	18	1220,5	
	25	1408,8	
C	0,001	25	146,93

7.3 Determinazione della conducibilità specifica del campione

Portare il campione acquoso a 25°C mediante termostato e procedere alla determinazione della resistenza o della conducibilità (*).
Se si dispone di strumenti dotati di compensatore di temperatura, effettuare direttamente la misura alla temperatura del campione.

8. Calcoli

Utilizzando apparecchiature in cui si legge la resistenza in ohm, la conducibilità specifica è data dall'espressione:

$$K = \frac{J}{R} \cdot 10^6$$

dove:
K = conducibilità ($\mu S \cdot cm^{-1}$) del campione, ad una delle temperature sperimentate;
J = costante (cm^{-1}) della cella;
R= resistenza (ohm) della cella riempita del campione.

Per apparecchiature, invece, in cui si misura direttamente la conduttanza in ohm, la conducibilità specifica è data dall'espressione:

$$K = J \cdot C_x \cdot 10^6$$

dove:
K = conducibilità specifica ($\mu S \cdot cm^{-1}$) del campione;
J = costante (cm^{-1}) della cella;
C_x = conducibilità (S) del campione.

9. Qualità del dato

La precisione degli strumenti disponibili è solitamente compresa tra 0,1 e 1%.

(*) Per misure di campo e di routine, in cui non si richieda una grande precisione, è possibile eseguire la determinazione in continuo facendo fluire l'acqua da esaminare attraverso la cella di conducibilità tenendo sempre conto della temperatura dell'acqua stessa.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA WEF (1998): "*Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA).

ASTM (1981): "*Book of Standards*", parte 23 (Philadelphia, ASTM).

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ (1997): "*Metodi per le acque destinate al consumo umano*", Rapporti ISTISAN 97/8, 35-39.

2040. Durezza

Introduzione

Il termine durezza fu originariamente coniato per definire la capacità di un'acqua di determinare la precipitazione di saponi. Questo fenomeno è dovuto principalmente agli ioni calcio e magnesio presenti in un'acqua. Anche altri ioni multivalenti possono dar luogo allo stesso fenomeno, ma spesso si trovano sotto forma di complessi e il loro contributo alla durezza si può considerare trascurabile. La durezza totale è definita quindi come la somma delle concentrazioni di ioni calcio e magnesio ed è espressa come mg/L di $CaCO_3$.
Sono in progressivo disuso i risultati espressi in gradi francesi (1 grado francese = 0,100 mmol/L = 10 mg/L come $CaCO_3$ o in gradi tedeschi (1 grado tedesco = 0,179 mmol/L = 10 mg/L come CaO).
Nel seguito vengono descritti due metodi, il primo basato sul calcolo della durezza a partire dalle concentrazioni di calcio e magnesio ricavate con altri metodi (Sezioni 3130 e 3180), il secondo su una titolazione complessometrica con EDTA.

METODO A

La durezza totale viene calcolata convertendo la somma delle concentrazioni molari di Ca e Mg per il peso molecolare del $CaCO_3$:

durezza (mg $CaCO_3$/L) = mmoli/$L_{(Ca+Mg)}$ x $P.M._{CaCO_3}$

Il metodo è applicabile a tutti i tipi di acque ed è quello che fornisce i risultati più accurati.

METODO B – Titolazione complessometrica con EDTA

1. Principio del metodo

La durezza totale si determina mediante complessazione con l'acido etilendiammino tetraacetico (EDTA), operando su un campione di acqua tamponato a pH 10±0,1 in presenza di nero eriocromo T usato come indicatore.
Una soluzione contenente Ca^{2+} e Mg^{2+} acquista in queste condizioni un colore rosso vino; quando tutto il calcio ed il magnesio sono stati complessati dall'EDTA la soluzione passa dal colore rosso vino al blu; questo è il punto finale della titolazione.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile alle acque naturali, in particolare a quelle adibite ad uso potabile ed industriale.

3. Interferenze e cause di errore

La determinazione chelometrica degli ioni Ca^{2+} e Mg^{2+} non può essere impiegata per acque intensamente colorate poichè il viraggio dell'indicatore in tali condizioni può risultare mascherato.
Anche sospensioni o sostanze organiche colloidali possono interferire, in quanto alterano il viraggio dell'indicatore. In questo caso il campione è portato a secchezza e calcinato in muffola a 600°C fino a completa distruzione della sostanza organica. Il residuo è ripreso con 20 mL di HCl 1 N, neutralizzato a pH 7 con NaOH 1 N e portato a 50 mL con acqua distillata. Raffreddato a temperatura ambiente, viene titolato con il procedimento descritto al Capitolo 7.
Molti ioni metallici interferiscono nella determinazione, sia perché vengono anch'essi titolati dall'EDTA, sia perché possono mascherare il punto finale.
Tali interferenze possono essere eliminate per aggiunta, prima della titolazione con EDTA, di un additivo che ha lo scopo di precipitare o di complessare i vari ioni interferenti.
In Tab. 1 sono riportate le concentrazioni massime (in mg/L) delle sostanze interferenti che possono essere presenti nel campione originale e che non inficiano il risultato dell'analisi stessa, usando l'additivo indicato. Per concentrazioni superiori ai valori riportati in tabella il metodo non può essere applicato e si dovrà impiegare il metodo A.

Tabella 1: Concentrazioni massime[(a)] (mg/L) delle sostanze interferenti che non inficiano i risultati delle analisi utilizzando gli additivi indicati. Il segno * a fianco di alcune specie indica che anche in presenza degli inibitori queste specie vengono titolate con EDTA e che la loro concentrazione contribuisce alla durezza

Specie chimica	Additivo
Al^{3+}	20
Ba^{2+}	*
Cd^{2+}	20
Co^{2+}	0,3
Cu^{2+}	20
Fe^{3+}	5
Pb^{2+}	20
Mn^{2+}	1
Ni^{2+}	0,3
Sr^{2+}	*
Zn^{2+}	200
Polifosfati	10

[(a)] basate su 25 mL di campione diluito a 50 mL

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". Se non è possibile effettuare la determinazione subito dopo il prelievo conservare il campione al buio e a 4°C per non più di 24 ore.

5. Apparecchiature

5.1 Buretta da 25 mL al decimo di mL

5.2 Capsula di porcellana da 250 mL

6. Reattivi

6.1 Soluzioni tampone

Usare una delle due soluzioni seguenti:

- sciogliere 16,9 g di NH_4Cl in 143 mL di NH_4OH concentrato e aggiungere 1,25 g del sale di Mg dell'EDTA. Diluire a 250 mL con acqua distillata;
- sciogliere 1,179 g di sale disodico dell'EDTA e 0,780 g di $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (o 0,644 g di $MgCl_2 \cdot 6H_2O$) in 50 mL di H_2O. Aggiungere 16,9 g di NH_4Cl e 143 mL di NH_4OH conc. Diluire a 250 mL con H_2O. Conservare in bottiglia di polietilene ben chiusa per impedire la volatilizzazione di NH_3 e la carbonatazione. La soluzione è stabile un mese.

6.2 Additivo (*)

Sciogliere 5 g di $Na_2S \cdot 9H_2O$ (o 3,7 g di $Na_2S \cdot 5H_2O$) in 100 mL di acqua distillata; la soluzione deve essere conservata fuori dal contatto dell'aria per evitare l'ossidazione del solfuro. Nel procedimento impiegare 1 mL di questo additivo.

6.3 Indicatore nero eriocromo T in pasticche.

6.4 Soluzione di $CaCl_2$

Trasferire 1,000 g di $CaCO_3$ anidro in un beuta da 500 mL e aggiungere HCl (1+1) molto lentamente fino a completa dissoluzione del sale. Aggiungere 200 mL di H_2O e portare la soluzione all'ebollizione per alcuni minuti per eliminare la CO_2. Raffreddare, aggiungere alcune gocce di indicatore rosso-metile ed aggiustare a color arancio aggiungendo poche gocce di una soluzione di NH_4OH 3 M o di HCl 6 M. Trasferire quantitativamente la soluzione in matraccio tarato da 1 L e portare a volume. (1 mL = 1 mg di $CaCO_3$).

6.5 Soluzione di EDTA 0,01 M

Utilizzare soluzioni di riferimento certificate a titolo noto disponibili in commercio.
In alternativa:
sciogliere 3,725 g di sale disodico diidrato dell'EDTA ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \cdot 2H_2O$) in acqua e portare a volume a 1000 mL. Determinare il titolo esatto della soluzione così ottenuta, utilizzando 50 mL della soluzione a titolo noto (6.4) secondo il procedimento descritto al Capitolo 7. La soluzione si conserva in bottiglia di polietilene e se ne controlla il titolo esatto periodicamente.

7. Procedimento

Diluire 25 mL di campione a 50 mL con acqua deionizzata in una capsula di porcellana o in altro opportuno contenitore; la diluizione 1+1 consente di limitare la precipitazione di $CaCO_3$. Aggiungere 1-2 mL di soluzione tampone; generalmente 1 mL è sufficiente ad ottenere un pH di 10±0,1. Se sono presenti le sostanze interferenti citate in precedenza aggiungere la soluzione dell'additivo (6.2).
Aggiungere una pasticca di nero eriocromo T. Titolare lentamente con EDTA agitando continuamente e facendo aggiunte con intervalli di 3-5 secondi, finchè il colore passa da rosso a blu. La titolazione deve essere eseguita immediatamente dopo l'aggiunta dell'indicatore poiché questo è instabile in ambiente alcalino.

(*) Per molte acque non è necessaria la presenza dell'additivo. In commercio si trovano già pronte sostanze che contengono sia l'additivo che il tampone.

La titolazione deve essere condotta a temperatura ambiente perchè in acqua calda si ha la decomposizione dell'indicatore. È importante che la soluzione sia mantenuta a pH 10; se il campione ha un pH maggiore può aversi la precipitazione di carbonato di calcio e di idrossido di magnesio. Tali precipitati passano lentamente in soluzione per aggiunta del reattivo titolante, ma danno luogo a risultati errati.
La presenza di CO_2 può essere eliminata per acidificazione e successivo riscaldamento, prima dell'aggiunta del tampone.
Poiché lo ione Mg^{+2} deve essere presente per avere un viraggio netto, si aggiunge al tampone una piccola quantità di sale di magnesio dell'EDTA.

8. Calcoli

La somma degli ioni Ca^{2+} e Mg^{2+} (durezza totale, D_T) si ottiene della relazione

$$D_T \text{ (mg } CaCO_3 \cdot L^{-1}) = \frac{A \cdot 0{,}01 \cdot 1000 \cdot P.M._{CaCO_3}}{C}$$

in cui:
A = volume (mL) di EDTA 0,01 M;
C = volume (mL) di campione prelevato.

9. Qualità del dato

Prove effettuate (n=6) da un singolo laboratorio su soluzioni sintetiche aventi durezza totale pari a 600 $mgCaCo_3 \cdot L^{-1}$ hanno fornito un valore del coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100, pari al 2,0% e un'esattezza dell'1%.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA).

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ (1997): "*Metodi per le acque destinate al consumo umano*", Rapporti ISTISAN 97/8, 52-55.

2050. Odore

Nelle acque alterazioni dell'odore possono essere di origine naturale (decomposizione di materiale vegetale) o antropica (contaminazione prodotta da effluenti urbani ed industriali, da composti secondari generati durante processi di ossidazione e disinfezione).

1. Principio del metodo

Il metodo prevede l'identificazione e la classificazione dell'odore e la misura della sua intensità. La determinazione dell'odore viene di norma eseguita per diluizione del campione in esame, con acqua inodore, al fine di valutare la diluizione più spinta alla quale può essere ancora percepito l'odore. Tale diluizione rappresenta la soglia di percezione dell'odore ed è una misura indiretta della sua "concentrazione" nel campione.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile a campioni di acque di scarico, superficiali e sotterranee nell'intervallo da 0 a n diluizioni. Il valore massimo di n dipende dal valore della soglia di percezione dell'operatore.

3. Interferenze e cause di errore

Si deve operare in assenza di odori estranei e sempre alla stessa temperatura. Il saggio non può essere eseguito operando di continuo per un tempo troppo lungo, onde evitare assuefazione olfattiva.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il prelievo va effettuato in bottiglia di vetro con tappo a smeriglio o in teflon, riempita raso collo. I campioni, da analizzare quanto prima possibile, vanno conservati alla temperatura di 4°C.

5. Apparecchiature

5.1 *Beute da 500 mL* a collo stretto con tappo a smeriglio.

5.2 *Termometro da 0 a 100°C*

5.3 *Serie di pipette da 1 mL, 2 mL e 5 mL*

5.4 *Burette da 25 mL*

5.5 *Cilindri da 150 e 250 mL*

La vetreria deve essere ben pulita e sciacquata con acqua inodore.

6. Reattivi

6.1 *Acqua inodore*, preparata facendo passare acqua potabile su carbone attivo in grani, alla velocità massima di 20 L/ora.

7. Procedimento

7.1 Determinazione preliminare dell'odore

Porre in una serie di beute 200 mL, 50 mL, 12 mL e 2,8 mL del campione da analizzare e portare a 200 mL con acqua inodore. Preparare un bianco con acqua inodore. Condurre la determinazione a freddo (25°C) e a caldo (60°C) dopo riscaldamento su bagno ad acqua. Raggruppare le soluzioni a coppie, costituite sempre dal bianco e da una delle soluzioni diluite; agitare tre o quattro volte prima di odorare, e, partendo da quella più diluita, classificare le beute in aventi odore e non aventi odore. Per aumentare la precisione, si odora ogni volta, prima del campione diluito, il bianco costituito da sola acqua inodore. Se non si rileva alcun odore passare alla soluzione con "concentrazione" immediatamente superiore fino alla prima percezione di odore.

7.2 Dosaggio quantitativo

Sulla base dei risultati del "test" preliminare eseguire una serie di diluizioni intermedie secondo la schema riportato in Tab. 1.

Tab. 1: Serie di diluizioni consigliate per la determinazione dell'odore

Volume di campione in cui si avverte la prima percezione di odore (mL)	Volumi da diluire a 200 mL
200	200; 140; 100; 70; 50
50	50; 35; 25; 17; 12
12	12; 8,3; 5,7; 4,0; 2,8
2,8	diluizioni intermedie

Procedere secondo le modalità indicate al Paragrafo 7.1, inserendo tra gli elementi della nuova serie di diluizioni uno o più bianchi. Indicare la presenza o assenza di odore in ciascuna beuta. Esempio:

mL di campione in 200 mL	12	0	17	25	0	35	50
Risposta	-	-	-	+	-	+	+

Determinare il volume minimo di campione necessario ad impartire odore percettibile all'acqua inodore. Il volume totale della soluzione, diviso il volume minimo necessario ad impartire odore rappresenta il valore della soglia di percezione dell'odore.

7.3 Classificazione degli odori

I vari odori, a seconda della loro natura, vengono classificati e codificati come segue (Tab. 2).

Tabella 2: Tipi di odore

Codice	Natura dell'odore	Descrizione dell'odore
A	Aromatico	Canfora, lavanda, limone, spezie
B	Balsamico	Fiori diversi
C	Chimico	non definibile
C_c	di cloro	Cloro libero
C_h	Idrocarburico	Petrolio e derivati
C_m	Medicinale o farmaceutico	Fenolo, iodoformio
C_s	Sulfureo	Idrogeno solforato
D	Sgradevole	non definibile
E	Terroso	Terra umida
F	Fecale	Pozzo nero
G	Erboso	Erba pestata
M	Muffa	Cantina umida
V	Vegetale	Radici vegetali

7.4 Sensibilità dell'operatore

La sensibilità dell'operatore viene controllata determinando il valore della soglia di percezione per l'alcool butilico. Essa corrisponde generalmente a un tenore in alcool butilico di 1-8 mg/L.

8. Calcoli

I risultati sono espressi con un numero rappresentante il valore della soglia di percezione dell'odore di cui si è precisata la natura.

$$\text{odore} = \frac{A+B}{A}$$

dove:
A = volume (mL) di campione prelevato;
B = volume (mL) di acqua inodore utilizzata per la diluizione.

Nell'esempio riportato in precedenza, la prima percezione dell'odore si ha quando 25 mL di campione sono diluiti a 200 mL; il valore di soglia è in tal caso:

$$\text{odore} = \frac{25+175}{25} = 8$$

Talvolta si può verificare una situazione anomala, vale a dire che una bassa concentrazione venga valutata positiva, mentre una concentrazione più alta negativa. In questi casi il valore di soglia è rappresentato dal punto di percezione oltre il quale non si verificano ulteriori anomalie.
C'è da osservare che il saggio descritto, basato sulla sensibilità dell'operatore può essere integrato da una valutazione oggettiva se può stabilirsi che l'odore di un'acqua è dovuto ad una specie chimica determinata; in tal caso potrà procedersi alla determinazione quantitativa di questa sostanza.

9. Qualità del dato

Per le caratteristiche intrinseche del metodo, essendo la percezione degli odori variabile da un individuo all'altro, non è possibile definire precisione e esattezza.

La significatività del "test" è tanto maggiore quanto più elevato è il numero dei valutatori; è consigliabile disporne di almeno cinque.
Nell'espressione dei risultati deve essere indicata la sensibilità di ciascun operatore.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA), 2-11/2-16.

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ (1997): "*Metodi per le acque destinate al consumo umano*", Rapporti ISTISAN 97/8, 15-20.

RODIER J. (1966): "*L'analyse chimique et physico-chimique de l'eau*", (Paris, Dunod), 16.

2060. pH

Introduzione

Il pH di una soluzione è definito dalla relazione:

$$pH = -\log_{10} a_{H+} \qquad (1)$$

dove a_{H+} è l'attività degli ioni idrogeno. Nel metodo elettrochimico proposto il valore del pH viene ricavato dalla misura della tensione elettrica (in Volt) della pila:

Elettrodo a calomelano saturo	Soluzione X	Elettrodo a vetro
a		c

dove a è l'elettrodo di riferimento generalmente a calomelano in KCl 3,5 M o soluzione satura, c è l'elettrodo a vetro, sensore del pH.
La «giunzione salina» tra a e la soluzione X è realizzata con una soluzione di KCl della stessa concentrazione di quella presente in a, interfacciata con X mediante setto poroso di vetro o porcellana o altro materiale (ponte salino).
La tensione di questa pila, alla temperatura T, può essere scritta nella forma:

$$V_T = K_T - \frac{RT}{F} 2{,}303 \log_{10} a_{H+}$$

$$= K_T + \frac{RT}{F} 2{,}303\, pH + E_{diff}$$

$$= K_T + \frac{RT}{F} 2{,}303\, pH + \frac{RT}{F} 2{,}303\, \Delta pH$$

$$= K_T + \frac{RT}{F} 2{,}303 \left(pH + \Delta pH\right) \qquad (2)$$

dove:
K_T rappresenta il valore della V_T per a_{H+}=1 e E_{diff}=0;
R = costante dei gas;
F = Faraday;
T= temperatura assoluta di misura;
E_{diff} = potenziale di giunzione liquida, il cui valore non è direttamente misurabile ma che può essere sperimentalmente reso molto piccolo.

La misura del pH risente principalmente di tre effetti:

a) Effetto di E_{diff} sulla misura del pH

E_{diff} dipende dalla geometria e dalle caratteristiche chimico-fisiche del ponte salino che rea-

lizza la giunzione liquida; dal tipo e dalla concentrazione dei sali presenti nella soluzione X. In base a quanto detto in precedenza, esso esplica una indeterminatezza sul valore di pH misurato pari a:

$$\Delta pH = \frac{F}{RT \cdot 2{,}303} E_{diff}$$

Impiegando come ponte salino KCl concentrato o saturo, come proposto nel presente caso, E_{diff} contribuisce, come termine additivo spurio, con:

- non più di ±0,05 unità di pH nel campo di pH 4÷10;
- non più di ±0,1 unità di pH per pH inferiori a 2 o superiori a 10.

Variazioni di questo ordine di grandezza sui rispettivi campi di pH non sono significative ai fini della determinazione del livello di inquinamento o di depurazione di un'acqua naturale o di scarico.

b) Effetto della temperatura sulla misura del pH

La temperatura gioca un ruolo rilevante sugli equilibri chimici che in un'acqua condizionano il pH. Inoltre, dal punto di vista della misura elettrochimica, variando la temperatura si ha nella (2) variazione sia della K_T, sia della pendenza Volt/pH (RT/F)·2,303. Mentre è possibile effettuare correzioni opportune per gli ultimi due effetti, nessuna previsione può essere fatta - se non di volta in volta, a prezzo di molta fatica e notevole incertezza - circa la dipendenza degli equilibri chimici, presenti in un sistema reale, dalla temperatura. La variazione di pH in funzione della temperatura è esemplificata dai diversi valori di pH assunti dalle soluzioni tampone indicate al Paragrafo 6.10.
Nei casi in cui sia necessario eliminare gli effetti dovuti alle variazioni di temperatura occorre condizionare termicamente gli elettrodi alla temperatura attuale del corpo idrico (o dello scarico) prima di effettuare la misura ed effettuare le misure di taratura alla stessa temperatura (±2°C).

c) Effetto dovuto a non specificità dell'elettrodo a vetro

Causa di errore di tipo strumentale può essere la presenza di ioni Na^+ a pH superiori a 8. Usando elettrodi appropriati l'errore alcalino, che dipende, a parità di tipo di vetro, dal rapporto concentrazione di ioni Na^+/concentrazioni di ioni H^+, è molto piccolo e costante.
Per esempio, in soluzione di NaCl 0,5 m (la molalità del NaCl nell'acqua di mare è di circa 0,43) usando elettrodi a basso errore di sodio si ha un errore (in meno) di 0,1 unità di pH a 13,7, mentre con elettrodi normali lo stesso errore si realizza ad un pH di 10,2. Altre indicazioni di carattere particolare verranno fornite nella descrizione del metodo.

1. Principio del metodo

Il pH di una soluzione viene determinato per via potenziometrica utilizzando, come sensore, un elettrodo a vetro combinato con opportuno elettrodo di riferimento. Il valore da determinare viene ottenuto dopo aver effettuato una operazione di taratura con due soluzioni tampone a pH noto portate alla stessa temperatura del campione (*).

(*) Nel caso in cui vengano impiegati strumenti muniti di dispositivi per la correzione del pH in funzione della temperatura è sufficiente conoscere i valori di temperatura e azionare opportunamente le manopole dello strumento.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile a campioni di acque naturali e di scarico nel campo di pH 1÷13 o 0÷8, a seconda che si usi un elettrodo a basso errore alcalino o un elettrodo a risposta lineare nella zona acida. Da ora in poi verrà considerato il primo tipo di elettrodo in quanto copre largamente le esigenze pratiche di applicazione nel controllo di un'acqua.

3. Interferenze e cause di errore

La risposta dell'elettrodo a vetro in misure non continue, per campioni diversi non è in genere influenzata dalla presenza di sistemi redox, di sostanze colorate e dalla torbidità della soluzione.
Condizionando correttamente l'elettrodo nei riguardi della temperatura e della composizione del campione, la risposta strumentale è rapida e costante.
Possono essere causa di errore:

- la presenza nel campione di sostanze in sospensione, come olii, grassi e colloidi, in quantità tali da ricoprire la superficie dell'elettrodo a vetro;
- la presenza di solidi sospesi o ioni in soluzione, che con il K^+ o il Cl^- del liquido di giunzione diano luogo alla formazione di sali insolubili, in quantità tali da impedire la formazione di una superficie di contatto riproducibile tra la soluzione in esame e l'elettrodo di riferimento. Tutti questi fenomeni sono evidenziati da larghe fluttuazioni, del tutto occasionali, del dato strumentale. In casi del genere può rendersi necessaria una cauta filtrazione o l'immissione, tra elettrodo combinato e il campione, di materiale inerte (ad esempio sabbia), contenuto in un tubo come da Fig. 1.

Ancora, nelle misure in campo con pHmetro portatile si possono avere notevoli difficoltà di misurazione se non si dispone di una efficiente schermatura dell'elettrodo a vetro e del suo cavo. In tal caso, è opportuno tenere lontano dal dispositivo di misura oggetti facilmente elettrizzabili, come ad esempio lana e fibre sintetiche.

4. Campionamento e conservazione del campione

La condizione ottimale di misura si realizza dirottando dal bacino idrico da analizzare un piccolo flusso di acqua che entri nella cella e lambisca l'elettrodo a vetro con soluzione sempre fresca, fuoriuscendo da un troppo pieno.
Si possono così evitare scambi con l'atmosfera, agitazione del campione nel recipiente di misura, ecc.
È però, di norma, più che sufficiente effettuare la misura all'atto del prelievo sul campione tal quale annotando la temperatura originale secondo le indicazioni riportate nel procedimento.
Se anche ciò non fosse possibile è necessario:

- riempire completamente con la soluzione il recipiente, precondizionato con successive aliquote di campione, e tapparlo a chiusura ermetica;
- evitare durante il trasporto sollecitazioni meccaniche e grossi sbalzi di temperatura;
- effettuare la misura quanto prima dopo aver riportato il recipiente di raccolta, ancora tappato, alla temperatura originale (a ±2°C) del campione. Quest'ultima precauzione deve essere adottata per campioni per i quali sia necessaria una misura a livello della seconda cifra decimale.

Processi fermentativi conseguenti ad una conservazione troppo lunga del campione prima della misura possono portare a risultati errati.

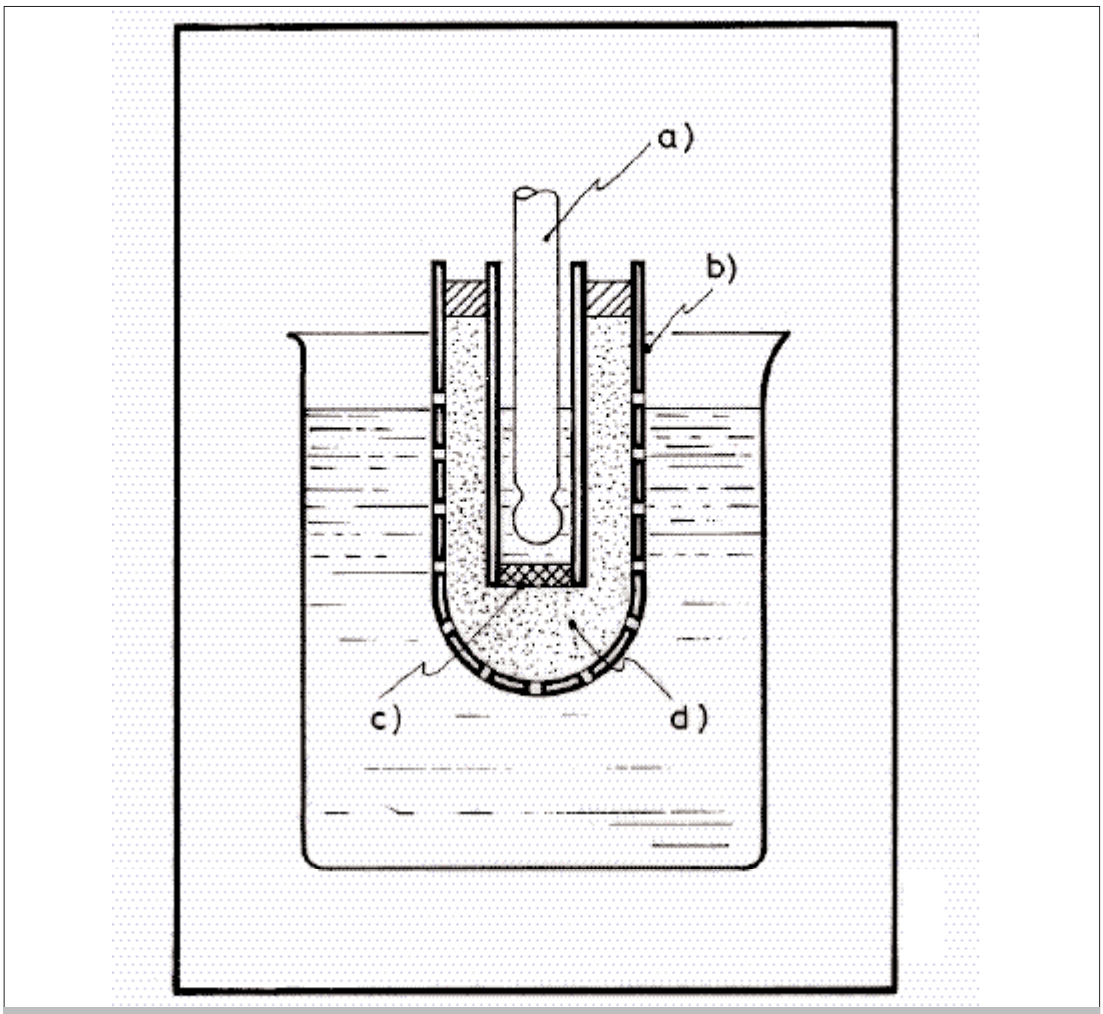


Figura 1: Esempio di dispositivo per la misura di campioni contenenti particelle in sospensione. a = elettrodo di misura; b = parete forata; c = membrana semi-permeabile; d = materiale inerte.

5. Apparecchiature

5.1 *pHmetro* predisposto per misure con elettrodo a vetro.

5.2 *Elettrodo a vetro* combinato con elettrodo di riferimento generalmente a calomelano in KCl 3,5 M o soluzione satura e giunzione salina con soluzione di KCl concentrata (3,5 M) o satura.
Usare elettrodi con risposta lineare nel campo di pH 1÷13, a basso errore alcalino e, possibilmente, a giunto normalizzato; poichè, la membrana dell'elettrodo di vetro è soggetta ad invecchiamento è opportuno eseguire periodici controlli sulla funzionalità dell'elettrodo verificandone la riproducibilità della risposta per immersioni alternate in soluzioni tampone a differenti pH.

5.3 *Termometro a 1/2 di grado* nel campo utile di temperatura.

5.4 *Agitatore magnetico* con barrette di teflon o altro materiale inerte.

5.5 *Termostato a ±1°C*

5.6 *Vetreria normale da laboratorio*

6. Reattivi

6.1 Acqua deionizzata o distillata, conservata fuori dal contatto della CO_2 dell'aria.

6.2 Timolo in cristalli

6.3 Triidrogeno diossalato di potassio biidrato ($C_4H_3KO_8 \cdot 2H_2O$)

Usare sale ricristallizzato da acqua a temperatura inferiore ai 50°C.

6.4 Idrogenoftalato di potassio ($C_8H_5KO_4$)

Usare sale puro per tamponi seccato in stufa a temperatura inferiore a 135°C.

6.5 Idrogenofosfato di sodio (Na_2HPO_4)

Usare sale puro per tamponi seccato in stufa per 2 ore a temperatura compresa tra 110 e 130°C.

6.6 Diidrogeno fosfato di potassio (KH_2PO_4)

Usare sale puro per tamponi.

6.7 Idrogenotartrato di potassio ($C_4H_5KO_6$)

Usare sale puro per tamponi.

6.8 Sodio tetraborato decaidrato ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$)

Usare sale puro per tamponi. La perdita di acqua di cristallizzazione in conseguenza di lunga conservazione nel tempo, non influenza ai fini dei presenti usi l'impiego della soluzione di sodio tetraborato decaidrato come riferimento.

6.9 Idrossido di calcio

Del carbonato di calcio puro per analisi viene scaldato a 1000°C per almeno 45 minuti. L'ossido formato viene raffreddato ed usato per ottenere la soluzione satura.

6.10 Soluzioni di riferimento

Ad eccezione della soluzione di tartrato, tutte le soluzioni riportate possono mantenere il loro pH, se inizialmente sterilizzate, a meno di 0,007 unità di pH per 28 mesi, anche se nel frattempo si sono formate muffe o depositi. In assenza di sterilizzazione, tali soluzioni possono essere utilizzate sino a quattro settimane dalla loro preparazione.
Nel caso del tartrato, se si aggiungono 2 cristalli di timolo il pH della soluzione rimane inalterato per più di due mesi, con una variazione non superiore a 0,01 unità.

6.10.1 Soluzione tampone di triidrogeno diossalato di potassio (pH=1,675 a 15°C e 20°C; 1,679 a 25°C).

Introdurre 12,61 g di triidrogeno diossalato di potassio biidrato (6.3) in un matraccio munito di tappo, sciogliere e diluire a 1000 mL con acqua (6.1).

6.10.2 Soluzione tampone di tartrato (pH=3,65 a 25°C)

Agitare vigorosamente un eccesso di idrogenotartrato di potassio (6.7) in un recipiente di ve-

tro o polietilene, munito di normale tappo, con acqua (6.1) a temperatura di 22-28°C. Filtrare e conservare in un recipiente tappato dopo aver aggiunto 4-5 cristalli di timolo.

6.10.3 Soluzione tampone di ftalato (pH=4,00 a 15°C e 20°C; 4,01 a 25°C).

Introdurre 10,12 g di idrogenoftalato di potassio (6.4) in recipiente di vetro o polietilene munito di tappo, sciogliere e diluire a 1000 mL con acqua (6.1).

6.10.4 Soluzione tampone di fosfati (pH=6,90 a 15°C; 6,88 a 20°C; 6,86 a 25°C).

Introdurre 3,88 g di diidrogenofosfato di potassio (6.6) e 3,53 g di idrogenofosfato di sodio (6.5) in un recipiente di vetro o polietilene munito di tappo, sciogliere e diluire a 1000 mL con acqua (6.1).

6.10.5 Soluzione tampone di fosfati (pH=7,45 a 15°C; 7,43 a 20°C; 7,41 a 25°C).

Introdurre 1,18 g di diidrogenofosfato di potassio (6.6) e 4,30 g di idrogenofosfato di sodio (6.5) in recipiente di vetro o polietilene munito di tappo, sciogliere e diluire a 1000 mL con acqua (6.1).

6.10.6 Soluzione tampone di tetraborato di sodio (pH=9,28 a 15°C; 9,22 a 20°C; 9,18 a 25°C).

Sciogliere 3,80 g di tetraborato di sodio decaidrato (6.8) in recipiente di polietilene munito di tappo, sciogliere e diluire a 1000 mL con acqua (6.1).

6.10.7 Soluzione tampone di idrossido di calcio satura a 25°C (pH=12,81 a 15°C; 12,63 a 20°C; 12,45 a 25°C).

Aggiungere ossido di calcio in un pallone contenente 500-1000 mL di acqua, sotto agitazione. La sospensione è scaldata all'ebollizione, raffreddata e filtrata su filtro in fibra di vetro a media porosità. Il solido è seccato e pestato sino a granulosità fine e uniforme, pronto per ulteriori usi.
La soluzione satura a 25°C, titolata con acido forte, non deve risultare più concentrata di 0,0206 molare. Conservare in recipiente di polietilene munito di tappo.

7. Procedimento

7.1 Taratura dello strumento

Predisporre lo strumento per la misura secondo le istruzioni della casa costruttrice. Se lo strumento ha un dispositivo per la correzione automatica della temperatura, immergere la corrispondente sonda resistiva nella soluzione di cui si vuol misurare il pH, agire sul dispositivo per la correzione ed effettuare la misura. Questa operazione deve essere ripetuta per tutte le soluzioni tampone necessarie alla costruzione della curva di taratura o alla predisposizione dello strumento per la misura di tamponi incogniti. Se invece la correzione è di tipo manuale, impostare il valore della temperatura di lavoro T_m. Portare le soluzioni tampone alla temperatura T_m (±5°C) mediante termostato.
Pulire la membrana dell'elettrodo con carta da filtro per leggero strofinio. Controllare che il liquido di giunzione dell'elettrodo combinato sia al livello previsto e, se necessario, rimboccare con soluzione di riserva. Immergere l'elettrodo nella soluzione di misura dopo averlo brevemente lavato con acqua e con detta soluzione. Attendere qualche minuto sino a raggiungimento dell'equilibrio termico.
Se si ricorre all'agitazione meccanica della soluzione, agitare per 30 secondi blandamente e misurare dopo un'attesa di altri 30 secondi circa (tra misura realizzata in quiete o sotto agi-

tazione possono verificarsi scostamenti in parte attribuibili ad una situazione di non riproducibilità del potenziale di giunzione liquida sotto agitazione).
Se l'elettrodo è stato conservato a lungo non immerso nella soluzione salina di giunzione, occorre condizionarlo con acqua per almeno due ore.
I valori dei pH delle due soluzioni tampone di riferimento, pH_1 e pH_2, debbono essere scelti in maniera tale che pH_x del campione sia possibilmente intermedio fra i due. Una volta raggiunti per il tampone 1 valori riproducibili a ±0,02 unità di pH, manovrare la manopola ("asimmetria" o "pH correction" o altro) in maniera da far coincidere il valore sperimentale con il valore teorico di pH_1. Se è il caso ripetere la misura su una nuova aliquota di tampone.
Lavare la cella e l'elettrodo con acqua e procedere analogamente con la soluzione tampone 2, aspettando sino a che il nuovo valore di pH rimanga costante entro +0,02 pH. Prendere nota del valore letto, senza operare più alcuna modifica sulle manopole dello strumento.
Riportare in diagramma in ascissa i valori di pH_1 e pH_2 sperimentali ed in ordinata i valori teorici, interpolando linearmente fra i 2 punti. Se necessario ripetere il procedimento per altri valori di T_m o per altre coppie di tamponi di riferimento.
Eccezione fatta per la correzione automatica o manuale della temperatura, si potrebbero lasciare sempre bloccate le manopole di "asimmetria" o di correzione di pH o correzione di pendenza ecc., utilizzando per ogni temperatura diagrammi di taratura ottenuti con soluzioni tampone di riferimento.
In genere se l'elettrodo combinato è correttamente conservato e non soggetto ad elevati sbalzi di temperatura, un diagramma di taratura, con i limiti di accuratezza accertati, può rimanere valido per dei mesi.

7.2 Misura

Condizionare l'elettrodo e la cella di misura secondo le modalità descritte in precedenza. A regime termico raggiunto, misurare la temperatura del campione e impostare sullo strumento il corrispondente valore nella correzione manuale di temperatura (nel caso di correzione automatica la sonda resistiva è stata introdotta nella cella sin dall'inizio).

8. Calcoli

Dal valore di pH misurato risalire al valore corretto utilizzando il diagramma di taratura ottenuto alla stessa temperatura (±2°C) ed in cui i valori di riferimento pH_1 e pH_2 comprendono il valore di pH_x misurato.

9. Qualità del dato

Nel caso di campioni contenenti CO_2, SO_2 o altre sostanze gassose che in soluzione partecipano ad equilibri acido-base, la precisione come l'esattezza dipendono dal grado di non alterazione di questi equilibri per scambi con l'atmosfera.
In genere, un'esattezza ed una precisione entro 0,05 unità di pH può essere facilmente raggiunta.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA).

2070. Salinità

La salinità è stata storicamente definita come la quantità di sali (misurata in grammi) contenuta in un kilogrammo di acqua di mare. La determinazione diretta della salinità di un'acqua naturale, effettuata attraverso la misura della concentrazione di tutti i sali in essa disciolti, è estremamente complessa e quindi non può essere considerata come metodo analitico pratico. Si ricorre pertanto ad un metodo indiretto basato sulla misura della conducibilità elettrica dell'acqua di mare e sul rapporto tra questa e la conducibilità di una soluzione di riferimento.
Dal 1978 viene utilizzata la Salinità Pratica (simbolo S), definita dal rapporto K_{15} tra la conducibilità elettrica del campione di acqua di mare, alla temperatura di 15°C ed alla pressione di una atmosfera standard, e la conducibilità elettrica di una soluzione di cloruro di potassio (KCl), nella quale la massa di KCl sia $32{,}4356 \times 10^{-3}$, nelle stesse condizioni di temperatura e pressione. Questo significa che tutti i rapporti di conducibilità sono riferiti ad una conducibilità di riferimento ben definita e riproducibile.
La determinazione della salinità adottata in passato, effettuata attraverso la determinazione della clorinità per titolazione degli ioni cloruro con metodo argentometrico, è pertanto da ritenersi attualmente obsoleta.

1. Principio del metodo

Il metodo è basato sulla determinazione del rapporto K_t tra la conducibilità del campione e quella di una soluzione di riferimento per la quale sia noto il K_{15}, misurate entrambe alla stessa temperatura t. Da K_t si risale alla salinità pratica del campione che risulta essere una quantità adimensionale.

2. Campo di applicazione

Il campo di applicazione riguarda salinità comprese tra 2 e 42.

3. Interferenze e cause di errore

La misura della conducibilità può venire alterata da eventuali sostanze oleose contenute nel campione, che possono adsorbirsi sulla superficie degli elettrodi.

4. Campionamento e conservazione del campione

I contenitori, in vetro e con tappo a tenuta, di volume in genere pari a 250 mL (il volume dipende dallo strumento utilizzato), devono essere accuratamente risciacquati due volte con l'acqua da analizzare prima di essere riempiti. Il riempimento deve essere totale per non lasciare aria all'interno del contenitore. Per evitare qualsiasi reazione, oltre a curare che la tenuta del tappo sia perfetta, si consiglia di conservare i campioni al buio in condizioni di temperatura costante. È comunque opportuno procedere alla determinazione il più presto possibile, per evitare fenomeni di evaporazione e conseguente concentrazione dei sali.

5. Apparecchiature

5.1 Salinometro

Gli strumenti più accurati e più diffusamente utilizzati nella pratica oceanografica sono i salinometri da laboratorio che hanno un elevato controllo della temperatura del campione e del materiale di riferimento.

6. Reattivi

6.1 Acqua di mare di riferimento

Il materiale di riferimento adottato da decenni dalla comunità scientifica mondiale è l'Acqua "Standard" IAPSO, che è costituita da acqua di mare naturale, filtrata, cui è stata aggiunta solamente acqua distillata. Il materiale di riferimento principale ha una salinità di circa 35 (serie P) e viene considerato valido per la taratura di salinometri da laboratorio su un valore singolo. Tale materiale di riferimento è certificato nel suo rapporto di conducibilità (K_{15}), relativo ad una soluzione a titolo noto di cloruro di potassio, ed in clorinità. Sono disponibili inoltre due materiali di riferimento a bassa salinità (serie L) di valore approssimativo 10 e 30, ed uno ad alta salinità (serie H) di valore circa 38, certificati nel medesimo modo.
Il materiale di riferimento IAPSO è commercializzato dallo Standard Seawater Service, gestito da Ocean Scientific International Limited, Brook Road, Wormley, Surrey, GU8 5UB, UK.

7. Procedimento

7.1 Determinazione del rapporto di conducibilità K_t

E' ottenuto dal rapporto tra la conducibilità del campione e quella del materiale di riferimento, misurate alla temperatura t:

$$K_t = K_t \text{ campione}/K_t \text{ materiale di riferimento}$$

La lettura deve avvenire alla stessa temperatura per campione e materiale di riferimento e deve rimanere costante durante la misura. Alcuni salinometri, che forniscono direttamente la misura del rapporto di conducibilità, dispongono di un bagno termostatato all'interno del quale la temperatura del campione o del materiale di riferimento viene stabilizzata prima della lettura. Nel caso in cui il campione provenga da ambiente estuarino può essere necessaria una taratura secondaria dello strumento, ottenuta con la costruzione di curve di diluizione.

8. Calcoli

Il seguente algoritmo consente il calcolo della salinità pratica:

$$S = a_0 + a_1K_t^{0,5} + a_2K_t + a_3K_t^{1,5} + a_4K_t^2 + a_5K_t^{2,5} + \Delta S$$

dove ΔS, nullo nel caso in cui la misura sia stata effettuata a 15°C, è:

$$\Delta S = (b_0 + b_1K_t^{0,5} + b_2K_t + b_3K_t^{1,5} + b_4K_t^2 + b_5K_t^{2,5}) \cdot f(t)$$

in cui: $$f(t) = (t\text{-}15)/[(1 + 0{,}0162(t\text{-}15)]$$

e i valori delle costanti sono:

a_0 = 0,0080	b_0 = 0,0005
a_1 = -0,1692	b_1 = -0,0056
a_2 = 25,3851	b_2 = -0,0066
a_3 = 14,0941	b_3 = -0,0375
a_4 = -7,0261	b_4 = 0,0636
a_5 = 2,7081	b_5 = -0,0144

Per estendere la salinità pratica a salinità inferiori, nell'intervallo 0-40, può essere applicata la seguente equazione:

$$S = S_{ps} - [a_0/(1+1,5X + X^2)] - [b_0 f(t)/(1 + Y^{0,5} + Y^{2,5})]$$

dove:
S_{ps} = valore determinato precedentemente per la salinità pratica;
$X = 400\ K_t$;
$Y = 100\ K_t$;
a_0, b_0 ed f(t) hanno i valori precedentemente definiti.

9. Qualità del dato

Poiché conducibilità e temperatura vengono determinate per via strumentale, la precisione finale deriva dalla precisione di tali misure. Attualmente, la precisione che si può ottenere con i migliori strumenti commerciali è pari a ±0,0002 unità di salinità.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard methods for the examination of water and wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA), 2-48/2-49.

FORCH C., KNUDSEN M. & SORENSEN S.P.L. (1902): "Berichte uber die Konstantenbestimmungen zur Aufstellung der hydrographiscen Tabellen", Kgl. Danske Vidensk Selsk. Skrifter, 6 Raekke Naturvidensk. Mathem. Afd., **12**, 1-151.

HILL K.D., DAUPHINE T.M. & WOODS D.J. (1986): "The extension of the practical salinity scale 1978 to low salinities", *IEEE J. Oceanic Eng.*, **OE-11**, 109.

UNESCO (1978): "*Eight report of the Joint Panel on Oceanographic Tables and Standards*, Woods Hole, March 1977", Unesco Techn. Pap. In Mar. Sci., **30**, 32p.

UNESCO (1981): "*The practical salinity scale 1978 and international equation of sea state of seawater 1980*", Unesco Techn. Pap. In Mar. Sci., **36**, 1-25.

UNESCO (1983): "*Algorithms for computations of fundamental properties of seawater*", Unesco Techn. Pap. In Mar. Sci., **44**, 1-53.

APPENDICE

Per la misurazione *in situ* della salinità lungo la colonna d'acqua si ricorre nella pratica all'utilizzo di sonde multiparametriche che includono sensori di conducibilità, temperatura e pressione ed acquisiscono questi dati con una frequenza fino a 30 campioni al secondo. Il

dato di salinità viene in genere riportato in uscita direttamente dallo strumento, dopo l'opportuna conversione dei segnali elettrici dei sensori, corretta in base agli algoritmi di calcolo predisposti dal costruttore. Per quanto riguarda la salinità, per essere affidabile lo strumento deve prevedere la taratura periodica con materiali di riferimento per il controllo della deriva strumentale. La sensibilità che si può conseguire con le migliori apparecchiature disponibili può raggiungere ±0,003 unità di salinità.
Se si utilizzano per la misura della conducibilità semplici conduttimetri da laboratorio o da campo, di costo certamente inferiore ai salinometri da laboratorio, bisogna essere consapevoli della minore accuratezza della misura. In ogni caso devono essere considerati i seguenti aspetti:

- lo strumento può essere utilizzato solo per misurare la conducibilità in campioni discreti o, se utilizzato *in situ*, soltanto nello strato superficiale, ma in tal caso deve essere prevista la compensazione della temperatura;
- deve essere adatto a misurare gli elevati valori di conducibilità propri delle acque marine, superiori nel mar Mediterraneo ai 50000 $\mu mhos \cdot cm^{-1}$;
- deve consentire una taratura che può essere effettuata considerando le seguenti conducibilità di riferimento a 25°C (APHA, 1998):

concentrazione di KCl (M)	**Conducibilità a 25°C ($\mu S \cdot cm^{-1}$)**
0,1	12890
0,2	24800
0,5	58670
1	111900

Anche se lo strumento è predisposto per fornire direttamente il valore di salinità, la conversione deve essere controllata utilizzando la soluzione di acqua di mare Acqua "standard" IAPSO mediante la quale, a partire dal K_{15} dichiarato, si può risalire al valore di salinità pratica.

2080. Sapore

I sapori fondamentali sono quattro: salato, dolce, amaro, acido. Altri sapori derivano dalla combinazione di due o più sapori fondamentali e dalla contemporanea percezione dell'odore. In molti casi risulta difficile differenziare le due sensazioni: il gusto di un'acqua è normalmente determinato dall'associazione di sapore ed odore.
Soluzioni di sali inorganici sono rivelabili al sapore, mentre tracce di sostanze organiche possono impartire ad un'acqua un sapore associato ad un odore.
Alterazioni del sapore di un'acqua possono avere origine naturale (presenza di alghe e attinomiceti, solubilizzazione di sali minerali contenuti nel terreno) o antropica (contaminazione da effluenti industriali ed urbani, da composti secondari generati durante processi di disinfezione, ossidazione, coagulazione).

1. Principio del metodo

Non esistono metodi strumentali ufficialmente riconosciuti che siano in grado di fornire una valutazione assoluta del sapore. Il metodo descritto consiste nell'assaporare l'acqua in esame e nel sottoporla a diluizioni successive, con acqua priva di qualunque sapore, fino a che l'analista non avverte più alcun sapore. La diluizione più spinta alla quale può essere ancora percepito il sapore (soglia di percezione del sapore) costituisce una misura indiretta della sua "concentrazione" nel campione.
Il metodo dipende dalla sensibilità dell'operatore; una valutazione rigorosa, basata su una maggiore rappresentatività, prevede l'impiego di almeno sei operatori.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile alle acque naturali non inquinate.

3. Interferenze e cause di errore

La vetreria impiegata deve essere ben pulita e sciacquata con acqua insapore. Non usare tappi di gomma, sughero o plastica.
Il saggio deve essere eseguito sempre alla stessa temperatura. Fumatori, bevitori di alcolici, o persone che consumino l'acqua in esame, non possono eseguire tale determinazione.
L'ambiente dove si svolge la prova e tutte le attrezzature impiegate devono essere privi di odore.
In presenza di cloro libero è necessario effettuare la prova sul campione tal quale e su un'aliquota addizionata di una quantità stechiometrica di tiosolfato di sodio. In questo caso si deve determinare il sapore di un bianco ottenuto aggiungendo la stessa quantità di tiosolfato.

4. Campionamento e conservazione del campione

I campioni di acqua da analizzare vanno conservati in bottiglie di vetro con tappo a smeriglio. Eseguire la determinazione nel più breve tempo possibile (entro 24 ore) in quanto processi chimici e biologici possono alterare il sapore o la sua intensità.

5. Apparecchiature

5.1 Normale vetreria di laboratorio

5.2 Termometro da 0 a 50°C

5.3 Serie di pipette da 1 mL, 2 mL, 5 mL

6. Reattivi

6.1 Acqua insapore

In genere si impiega acqua di sorgente o di pozzo. La filtrazione dell'acqua su carbone attivo non è consigliata, poiché il sapore viene alterato.

7. Procedimento

7.1 Determinazione preliminare del sapore

Effettuare una determinazione preliminare del sapore, prelevando volumi variabili del campione da analizzare (ad esempio 200 mL, 50 mL, 12 mL, 4 mL) e diluendoli con acqua priva di sapore (6.1), a 200 mL in beute con tappo a smeriglio da 500 mL. Preparare un bianco con acqua insapore (6.1). Tali soluzioni vanno agitate e quindi degustate.
Per degustare si possono usare due metodi:

1) si sorbisce un po' d'acqua, la si porta da un lato all'altro della bocca, quindi la si sputa;
2) si lascia una piccola quantità d'acqua nella parte anteriore della bocca, in contatto con le papille della punta della lingua, senza agitare, per 5-10 secondi (ciò particolarmente per acque fredde).

Ordinariamente sono necessarie più degustazioni a temperature diverse; ad esempio:

- a freddo, cioè alla temperatura ordinaria di 15-20°C;
- a caldo (40°C).

Inoltre è spesso importante fare degustazioni dopo 24 ore, a circa 25°C e dopo 10 minuti di ebollizione, raffreddamento e aerazione senza violenta agitazione.
Per aumentare la precisione di questo saggio è opportuno, prima di ogni assaggio, sciacquarsi la bocca con acqua insapore. Degustare i diversi campioni, iniziando da quello a concentrazione più bassa, fino alla prima percezione del sapore.

7.2 Dosaggio quantitativo

Sulla base dei risultati ottenuti nel "test" preliminare (7.1) preparare una serie di diluizioni intermedie secondo lo schema riportato in Tab. 1.

Tabella 1: Serie di diluizioni consigliate per la determinazione del sapore

Volume di campione in cui si avverte la prima percezione di sapore (mL)	Volumi da diluire a 200 mL
200	200; 100; 70; 50; 35; 25; 17
50	50; 35; 25; 17; 12; 8; 6
12	12; 8; 6; 4; 3; 2; 1
4	diluizioni intermedie

Il saggio consiste nel determinare il volume minimo dell'acqua in esame che impartisce un sapore percettibile all'acqua insapore. Il volume totale diviso tale volume minimo rappresenta il valore della soglia di percezione per il sapore.

7.3 Classificazione dei sapori

I vari sapori, a seconda della loro natura, sono classificati e codificati come segue (Tab. 2):

Tabella 2: Lista (non limitativa) dei tipi di sapore

Codice	Natura del sapore	Descrizione del sapore
M	**Origine minerale**	
Mb	Sapore di bicarbonato sodico	Acqua gassata
Mg	Sapore magnesiaco	Salato e amaro
Mn	Sapore metallico	Tracce di Fe o di Cu
Ms	Sapore salato	0,5 g/L di NaCl al minimo
O	**Origine organica**	
Oh	Sapore di idrocarburi	Petrolio e derivati
Om	Sapore medicinale	Prodotti fenolici
Ot	Sapore di terra	
Ov	Sapore di sostanze vegetali	Acque stagnanti

7.4 Sensibilità dell'operatore

La sensibilità dell'operatore viene controllata determinando il valore della soglia di percezione per una soluzione contenente 0,01 mg/L di fenolo alla quale vengono aggiunti 0,1 mg di cloro libero.

8. Calcoli

I risultati sono espressi da un numero che rappresenta il rapporto di diluizione determinato ossia il valore della soglia di percezione del sapore di cui si è precisata la natura.

$$\text{sapore} = \frac{A + B}{A}$$

dove:
A = volume (mL) di campione prelevato;
B = volume (mL) di acqua insapore utilizzata per la diluizione.

In Tab. 3 sono riportati i valori di soglia del sapore corrispondenti alla varie diluizioni

Tabella 3: Valori di soglia del sapore

Volume di campione (mL)	Volume di acqua di diluizione (mL)	Valore di soglia del sapore
200	0	1
100	100	2
70	130	3
50	150	4
35	165	6
25	175	8
17	183	12
12	188	17
8	192	25
6	194	33
4	196	50
3	197	67
2	198	100
1	199	200

In Tab. 4 sono raccolti i limiti di percezione dei sapori espressi in mg/L.

Tabella 4: Limiti di percezione dei sapori (mg/L)

Sostanza	Nettamente riconoscibile	Debolmente percettibile	Non rivelabile
$CaCl_2$, NaCl	600	300	150
$MgC1_2$	100	60	-
$FeSO_4$	7	3,5	1,75
$CuSO_4$	7	3,5	1,75
$FeCl_3$	30	15	7,50
H_2S	1,15	0,55	0,30
$Ca(OCl)_2$	0,5	0,2	0,05
Cl_2	0,1	0,05	0,01

9. Qualità del dato

Il metodo dipende dalla sensibilità dell'operatore; nell'espressione dei risultati va indicata, pertanto, la sensibilità dell'operatore.
Una valutazione rigorosa, basata su una maggiore rappresentatività, prevede l'impiego di almeno sei operatori.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA), 2-16/2-18.

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ (1997): "*Metodi per le acque destinate al consumo umano*", Rapporti ISTISAN 97/8, 21-26.

RODLER J. (1966): "*L'Analyse chimique et physico-chimique de l'eau*", (Paris, Dunod).

2090. Solidi

I solidi rappresentano il materiale disciolto o in sospensione in un'acqua naturale o di scarico. Un contenuto elevato di solidi disciolti può rendere un'acqua potabile di scarsa palatabilità o inadatta per molte applicazioni industriali; un contenuto elevato di solidi sospesi può condizionare gli usi estetico-ricreativi. Le analisi dei solidi sono importanti nel controllo dei processi di trattamento chimico-fisico e biologico delle acque di scarico.
In Fig. 1 è riportato un elenco delle possibili forme in cui i solidi possono essere presenti nelle acque. Vengono quindi descritti i metodi per la determinazione delle forme più importanti per la definizione delle caratteristiche di qualità di un'acqua (metodo A, Solidi totali disciolti; metodo B; Solidi totali sospesi; metodo C, Solidi sedimentabili; metodo D, Solidi fissi).

METODO A – Solidi totali disciolti

Introduzione

Con il termine di solidi totali disciolti s'intende il residuo che permane in una capsula, dopo evaporazione di un campione d'acqua, previamente filtrato, e conseguente essiccamento in stufa a temperatura definita. Le temperature di essiccamento di norma utilizzate sono: 103-105°C; 180±2°C.
I residui essiccati a 103-105°C possono contenere non solo acqua di cristallizzazione, ma anche di occlusione meccanica. A questa temperatura, alla perdita di anidride carbonica contribuisce sostanzialmente la trasformazione dei bicarbonati in carbonati; inoltre le perdite di materiale organico per volatilizzazione sono molto esigue se la temperatura viene mantenuta costante. Poiché l'espulsione dell'acqua di occlusione è solo parziale a 105°C, il raggiungimento del peso costante, condizione determinante per una buona misura, non è sempre ottenibile rapidamente. Il residuo essiccato a 180±2°C perde quasi tutta l'acqua di occlusione, ma parte dell'acqua di cristallizzazione può rimanere, specialmente se sono presenti solfati. A loro volta le sostanze organiche sono rimosse per volatilizzazione, ma non completamente distrutte. I bicarbonati vengono trasformati in carbonati e questi possono essere parzialmente decomposti in ossidi e sali basici.
In genere, evaporando ed essiccando a 180±2°C un campione d'acqua si ottengono valori che sono maggiormente confrontabili con quelli che risultano dalla somma delle concentrazioni dei vari sali minerali singolarmente determinate.
L'analista dovrà scegliere la temperatura di essiccamento più adatta al tipo di acqua da esaminare. Acque che hanno un basso contenuto di sostanze organiche e di sali minerali possono essere analizzate con entrambe le procedure; acque contenenti, invece, quantità notevoli di sostanze organiche o il cui pH superi il valore di 9 devono essere essiccate alla temperatura più alta. In ogni caso, nell'analisi dovrà essere indicata la temperatura di essiccamento scelta.

1. Principio del metodo

Un campione d'acqua viene filtrato attraverso un filtro da 0,45 μm e il filtrato viene essiccato fino a peso costante in stufa alla temperatura di 103-105°C o a quella di 180±2°C. L'aumento in peso della capsula di essiccamento, rispetto al peso della stessa vuota, rappresenta il valore dei solidi totali disciolti.

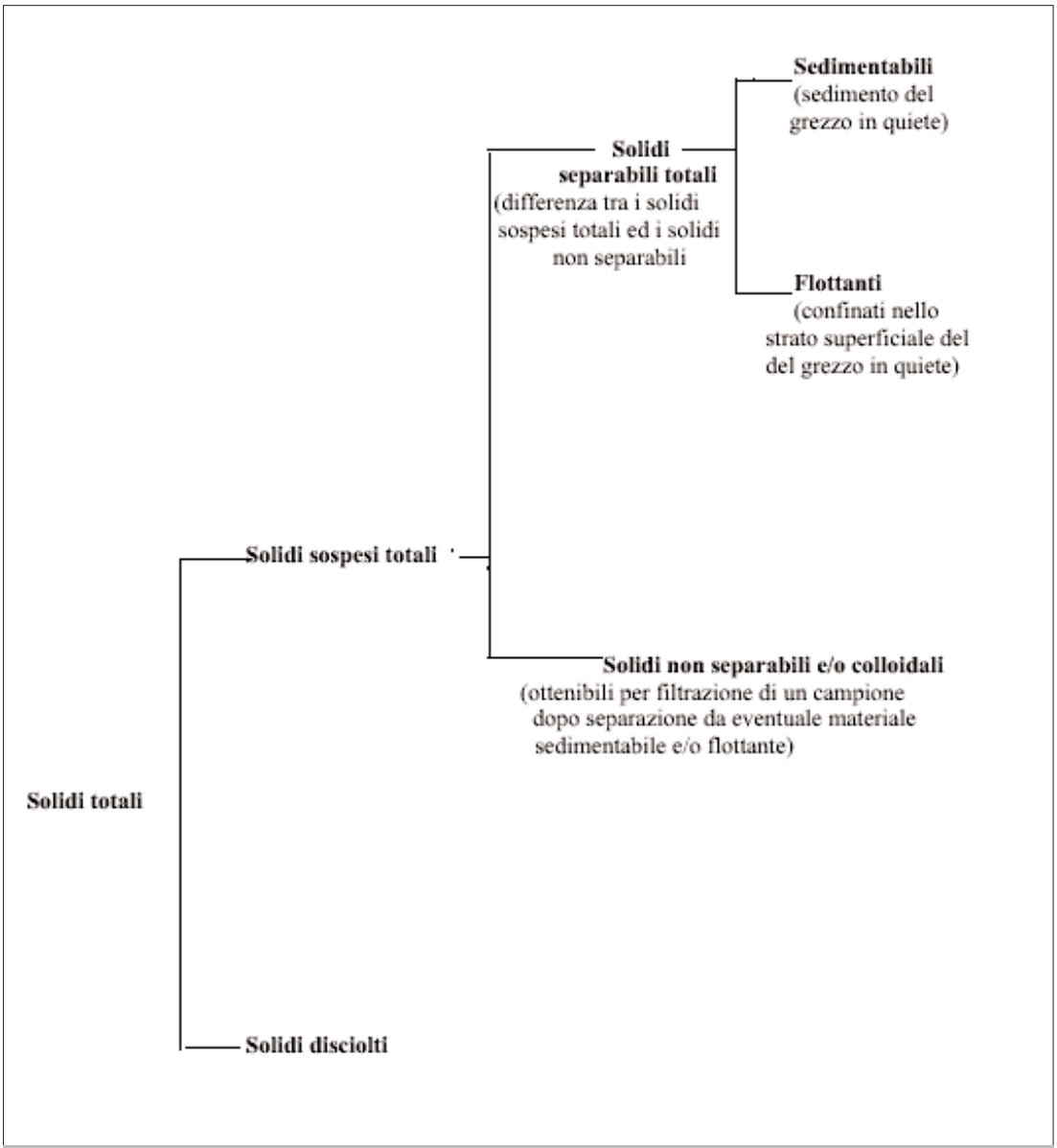


Figura 1: Elenco delle possibili forme dei materiali che possono essere presenti nelle acque e relative note esplicative.

2. Campo di applicazione

Il metodo è generalmente applicabile ad acque dolci e di scarico in ogni intervallo di concentrazione di solidi totali disciolti.

3. Interferenze e cause di errore

Trattandosi di una misura di tipo gravimetrico, i risultati possono essere affetti da errori dovuti alla perdita di anidride carbonica e di composti volatili durante l'evaporazione e l'essiccamento. Per quanto riguarda i residui di acque ad elevato contenuto di oli e di grassi, i risultati sono condizionati dalla difficoltà di essiccare il residuo in un tempo ragionevole. Errori dovuti a tempi di essiccamento insufficienti o a procedure di pesata troppo lente possono verificarsi con acque caratterizzate da elevate concentrazioni di sali igroscopici (es. sali contenenti ioni calcio, magnesio, cloruro, solfato).

4. Campionamento e conservazione del campione

Si consiglia di conservare il campione d'acqua in contenitori di plastica o di vetro resistente. Per campioni contenenti ioni di ferro o manganese, occorre evitare che l'ossigeno atmosferico venga in contatto con l'acqua da esaminare; inoltre è necessario analizzare i campioni nel più breve tempo possibile al fine di ridurre al minimo la possibilità di variazioni chimiche o fisiche o biologiche durante la conservazione.

5. Apparecchiature

5.1 *Capsule* di 150-200 mL di capacità, costituite dai seguenti materiali:

- Platino: generalmente soddisfacente per ogni test in quanto non viene attaccato dai sali minerali e contemporaneamente non subisce cambiamenti di rilievo durante le operazioni di riscaldamento.
- Porcellana, Vycor o Pyrex: soddisfacenti per campioni il cui valore di pH sia al di sotto di 9.

5.2 *Bagno ad acqua*

5.3 *Stufa a convezione naturale*, munita di termostato capace di mantenere costante la temperatura entro ±1°C.

5.4 *Essiccatore* provvisto di un indicatore colorato per segnalare il grado di esaurimento dell'agente essiccante.

5.5 *Bilancia analitica* di 200 g di capacità con risoluzione di 0,1 mg.

5.6 *Apparecchio per filtrazione sotto vuoto*, adeguato al tipo di filtro prescelto.

5.7 *Membrane filtranti* con diametro compreso tra 50 e 100 mm con pori di diametro medio di 0,45 μm.

6. Reattivi

In questo metodo non è previsto l'uso di reattivi.

7. Procedimento

Tenere la capsula preliminarmente in stufa per circa un'ora alla stessa temperatura scelta per la determinazione del residuo. Dopo accurato mescolamento, prelevare una aliquota del campione di acqua in esame che possa presumibilmente fornire un residuo compreso tra 25 mg e 250 mg e procedere alla filtrazione sotto vuoto. Un calcolo preliminare fatto in base alla conducibilità specifica è normalmente sufficiente per determinare il volume da evaporare. Se la filtrazione richiede più di dieci minuti, aumentare le dimensioni del filtro o ridurre il volume di campione.
Lavare per tre volte il filtro con acqua deionizzata (10 mL per volta), facendo asciugare il filtro tra un lavaggio e l'altro e, a filtrazione completata, mantenere il vuoto per tre minuti.
Trasferire il filtrato con i lavaggi nella capsula ed evaporare in bagno ad acqua. Dopo completa evaporazione dell'acqua dal residuo, trasferire la capsula in stufa alla temperatura di 103-105°C oppure 180±2°C.
Essiccare il residuo fino a peso costante (si considera costante quello ottenuto quando la variazione di peso tra due serie successive di riscaldamento, raffreddamento e pesata non superi il valore di 0,5 mg).

Lasciar raffreddare brevemente la capsula all'aria prima di porla ancora calda nell'essiccatore e completare successivamente il raffreddamento in atmosfera secca. E' opportuno non sovraccaricare l'essiccatore con troppe capsule, evitando che le stesse vengano in contatto reciprocamente o con le pareti dell'essiccatore stesso.
Pesare la capsula non appena sia completamente raffreddata. Il residuo non deve rimanere per molto tempo nell'essiccatore, poiché residui molto igroscopici possono rimuovere umidità da un essiccatore la cui atmosfera non sia completamente secca.

8. Calcoli

Il contenuto di solidi totali disciolti alla temperatura scelta è dato da:

$$\text{Solidi totali disciolti (mg/L)} = \frac{(M_1 - M_2) \cdot 1000}{V}$$

dove:
M_1 = peso (mg) della capsula e del residuo dopo essiccamento;
M_2 = peso (mg) della capsula;
V = volume (mL) di campione sottoposto a filtrazione.

9. Qualità del dato

Determinazioni (n=5) effettuate da tre laboratori su campioni aventi una concentrazione di solidi totali disciolti pari a 300 mg/L hanno fornito un coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio) · 100, del 7%.

METODO B – Solidi sospesi totali

Con il termine solidi sospesi totali si intendono tutte quelle sostanze indisciolte, presenti nel campione di acqua da esaminare, che vengono trattenute da un filtro a membrana, di determinata porosità, quando il campione stesso viene sottoposto a filtrazione. Il filtro da usarsi, per ottenere una separazione della totalità di solidi sospesi (colloidali compresi), deve avere pori di diametro medio pari a 0,45 µm.

1. Principio del metodo

I solidi sospesi totali presenti in un'aliquota di campione d'acqua vengono raccolti per filtrazione su un apposito filtro a membrana e determinati per via gravimetrica dopo essiccamento del filtro ad una temperatura di 103-105°C fino a peso costante.
Se il tempo richiesto per la filtrazione risulta troppo lungo (superiore a un'ora) è opportuno operare una prefiltrazione del campione su filtro avente porosità superiore a 0,45 µm e filtrare il liquido risultante su filtro da 0,45 µm. Il contenuto di solidi sospesi si determina dalla somma dei due residui. Una stima dei solidi sospesi totali può essere ottenuta calcolando la differenza tra il valore dei solidi totali* e quello dei solidi totali disciolti.
Nel caso la determinazione sia finalizzata alla verifica dei limiti previsti dalle Tabb. 1, 3, 4 dell'All. 5 del D.Lgs. 152/99, la membrana filtrante utilizzata dovrà avere pori di diametro medio pari a 0,45 µm.

* Per la determinazione dei solidi totali si può fare riferimento al protocollo descritto nel metodo A eliminando la fase di filtrazione del campione.

2. Campo di applicazione

Il metodo è generalmente applicabile ad acque naturali e di scarico in ogni intervallo di concentrazione di solidi sospesi totali.

3. Interferenze e cause di errore

Per campioni caratterizzati da elevate concentrazioni di solidi disciolti, è opportuno lavare accuratamente il filtro con acqua deionizzata per assicurare la completa rimozione del materiale disciolto dal filtro ed evitare sovrastime del contenuto di solidi sospesi.
Analogamente, tempi di filtrazione eccessivamente lunghi, causati dall'occlusione dei pori della membrana filtrante, determinano una sovrastima del contenuto di solidi sospesi per l'incremento della quantità di materiale colloidale catturato dal filtro intasato.

4. Campionamento e conservazione del campione

E' necessario analizzare i campioni nel più breve tempo possibile al fine di ridurre al minimo la possibilità di variazioni chimiche o fisiche o biologiche durante la conservazione.

5. Apparecchiature

5.1 *Apparecchio per filtrazione sotto vuoto*, adeguato al tipo di filtro prescelto.

5.2 *Membrane filtranti* con diametro compreso tra 50 e 100 mm con pori di diametro medio di 0,45 µm.

5.3 *Stufa a convezione naturale*, munita di termostato capace di mantenere costante la temperatura entro ±1°C.

5.4 *Essiccatore* provvisto di un indicatore colorato per segnalare il grado di esaurimento dell'agente essiccante.

5.5 *Bilancia analitica* di 200 g di capacità con risoluzione di 0,1 mg.

6. Reattivi

In questo metodo non è previsto l'uso di reattivi.

7. Procedimento

Porre il filtro per 1 ora in stufa alla temperatura di 105°C; lasciarlo raffreddare in essiccatore per 30 minuti e pesarlo al decimo di milligrammo. Collocare il filtro nell'apparecchio di filtrazione.
Prelevare un'opportuna aliquota del campione da analizzare, dopo preventiva omogeneizzazione, ed effettuare la filtrazione sotto vuoto, avendo cura di lavare il dispositivo di prelievo (cilindro graduato o altro) con il liquido filtrato. Per campioni a bassa torbidità (50 mg/L SiO_2 o meno) il volume prelevato deve esser almeno di un litro, mentre per valori di torbidità più elevati deve essere tale da fornire da 20 a 100 mg di solidi sospesi.
Lavare per tre volte il filtro con acqua deionizzata (10 mL per volta) e, a filtrazione completata, mantenere il vuoto per tre minuti.
Ultimata la filtrazione, trasferire il filtro con il suo contenuto in una stufa alla temperatura di 105°C. Dopo 1 ora lasciar raffreddare il filtro in essiccatore per 30 minuti e pesare.

Ripetere l'operazione fino ad ottenere un peso costante o fino a quando la perdita di peso sia inferiore a 0,5 mg.

8. Calcoli

Il contenuto di solidi totali sospesi è dato da:

$$\text{Solidi totali sospesi (mg/L)} = \frac{(M_1 - M_0) \cdot 1000}{V}$$

dove:
M_1 = peso (mg) del filtro e del residuo dopo essiccamento;
M_0 = peso (mg) del filtro;
V = volume (mL) di campione sottoposto a filtrazione.

9. Qualità del dato

Determinazioni (n=5) effettuate da tre laboratori su campioni aventi una concentrazione di solidi sospesi pari a 15 mg/L hanno fornito un coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100, del 33%. A concentrazioni più elevate (200 mg/L) il coefficiente di variazione è risultato pari al 10%.

METODO C – Solidi sedimentabili

Con il termine di solidi sedimentabili si intendono quei solidi che sedimentano quando il campione di acqua in esame viene lasciato in condizioni di quiete per un periodo di tempo determinato.

1. Principio del metodo

La misura dei solidi sedimentabili può essere effettuata per via volumetrica o gravimetrica.
Nel primo caso i solidi sedimentabili vengono determinati mediante immissione in un cono di Imhoff di 1000 mL di acqua in esame e successiva misura del volume occupato sul fondo del cono dai solidi sedimentati in un periodo di tempo determinato.
Nel secondo caso si determina il peso della parte solida dello stesso volume di fango.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ad acque dolci e di scarico in ogni intervallo di quantità di solidi sedimentabili.

3. Interferenze e cause di errore

Il metodo non presenta interferenze. Alcune classi di sostanze naturali ed artificiali, quali ad esempio fibre cellulosiche e tessili, sia sintetiche che naturali, a causa della notevole voluminosità che possono presentare i loro sedimenti, danno luogo a dei precipitati di notevole volume apparente. In tali casi la determinazione volumetrica non risulta correlabile con la determinazione dei solidi totali e si deve ricorrere alla misura gravimetrica.

4. Campionamento e conservazione del campione

E' necessario analizzare i campioni nel più breve tempo possibile al fine di ridurre al minimo la possibilità di variazioni chimiche o fisiche o biologiche durante la conservazione.

5. Apparecchiature

5.1 *Materiale* di uso comune di laboratorio.

5.2 *Cono di Imhoff graduato da 1000 mL*, in vetro, corredato di apposito supporto (Fig. 2).

5.3 *Contatempo da laboratorio*

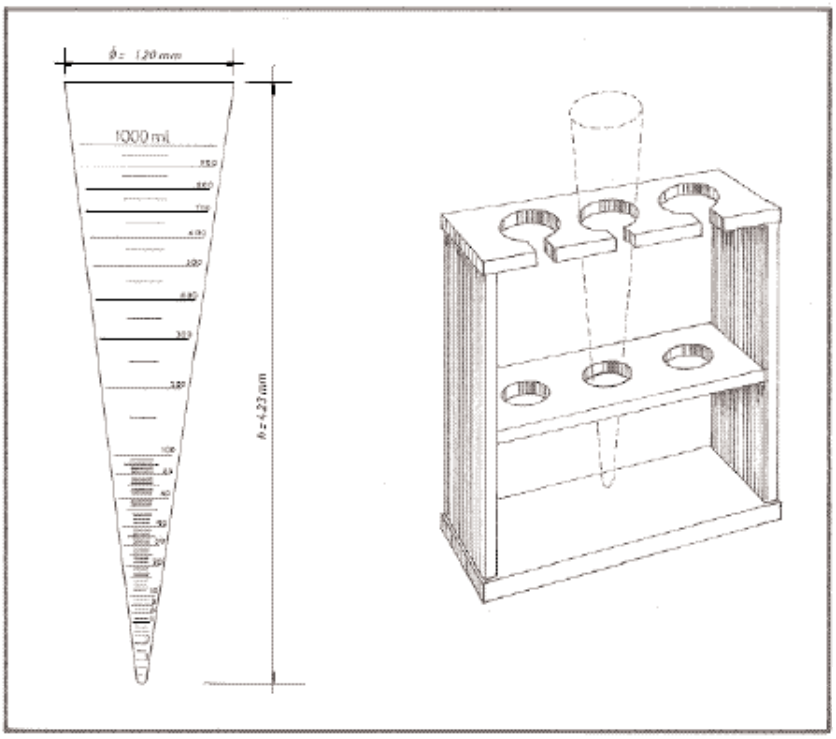


Figura 2: Cono di Imhoff da 1000 mL con relativo supporto.

6. Reattivi

In questo metodo non è previsto l'uso di reattivi.

7. Procedimento

7.1 *Metodo volumetrico*

Riempire fino al segno di 1000 mL un cono Imhoff con un campione di acqua vigorosamente mescolato. Lasciare sedimentare per un tempo fissato (in genere 30 minuti) intervenendo di tanto in tanto, cautamente, con una bacchetta di vetro lungo la parete del cono, per staccare i solidi eventualmente aderenti ad essa, ed imprimendo allo stesso un leggero movimento rotatorio. Trascorso il tempo fissato annotare il valore dei solidi sedimentati.

7.2 Metodo gravimetrico

In questo caso il cono è dotato di un opportuno dispositivo che consente di raccogliere il materiale sedimentato sul fondo del cono. Detto materiale viene trasferito in una capsula previamente tarata, essiccato fino a peso costante e pesato.

8. Calcoli

8.1 Metodo volumetrico

La misura del volume, espresso in mL, occupato sul fondo del cono graduato dalle sostanze sedimentate da 1000 mL di campione dà direttamente il valore dei solidi sedimentabili espressi in mL/L.
Accanto al valore dei solidi sedimentabili riportare la durata della sedimentazione, espressa in ore.
Questo procedimento consente di ottenere un indice (mL/L) che non è omogeneo con le unità di misura utilizzate nella determinazione degli altri tipi di solidi; tuttavia tale indice fornisce utili indicazioni sul volume di fango che si ottiene in un procedimento di sedimentazione.

8.2 Metodo gravimetrico

Il peso dei solidi essiccati si esprime in mg/L, riferendosi al volume di campione d'acqua prelevato.

METODO D – Solidi fissi e volatili a 600°C

La determinazione dei solidi fissi e volatili fornisce una stima molto grossolana della sostanza organica contenuta nella frazione solida di un'acqua di scarico o di un fango attivo; per questo motivo viene spesso utilizzata per controllare il funzionamento degli impianti di trattamento delle acque.

1. Principio del metodo

I residui ottenuti eseguendo i metodi A (Solidi totali disciolti) e B (Solidi sospesi totali) vengono inceneriti in muffola alla temperatura di 600°C per un'ora. I solidi rimanenti dopo il trattamento di incenerimento rappresentano i solidi fissi mentre la frazione perduta nel riscaldamento rappresenta i solidi volatili.

2. Campo di applicazione

Il metodo è generalmente applicabile a tutti i tipi di acque e in ogni intervallo di concentrazione di solidi.

3. Interferenze e cause di errore

Errori significativi possono essere commessi nella determinazione di basse concentrazioni di solidi volatili in presenza di elevate concentrazioni di solidi fissi; in questi casi è opportuno ricorrere ad altri tipi di misure (Sezione 5040 Carbonio organico totale).

4. Campionamento e conservazione del campione

È necessario analizzare i campioni nel più breve tempo possibile al fine di ridurre al minimo la possibilità di variazioni chimiche o fisiche o biologiche durante la conservazione.

5. Apparecchiature

Vedi Capitolo 5 dei metodi A e B.

6. Reattivi

In questo metodo non è previsto l'uso di reattivi.

7. Procedimento

Incenerire i residui ottenuti nella determinazione dei solidi disciolti totali e dei solidi sospesi totali in muffola alla temperatura di 600°C per un'ora. Incenerire anche un filtro dello stesso tipo di quello utilizzato per la determinazione dei solidi sospesi totali, per la correzione del contributo delle ceneri provenienti dal filtro. Tale contributo è molto consistente se si sono utilizzati filtri in fibra di vetro. Dopo l'incenerimento, lasciar raffreddare parzialmente i recipienti all'aria finchè la maggior parte del calore sia dissipata e trasferire quindi capsula e filtri in essiccatore per un completo raffreddamento in atmosfera secca.
Ripetere il ciclo di operazioni (incenerimento, raffreddamento, essiccamento e pesata) fino ad ottenere un peso costante o fino a quando la perdita di peso sia inferiore a 0,5 mg.

8. Calcoli

8. 1 Solidi totali volatili

Il contenuto di solidi totali volatili è dato da:

$$\text{Solidi totali volatili (mg/L)} = \frac{(M_1 - M_0)\cdot 1000}{V}$$

dove:
M_1 = peso (mg) del residuo + peso (mg) della capsula o del filtro prima dell'incenerimento;
M_0 = peso (mg) del residuo + peso (mg) della capsula o del filtro dopo l'incenerimento;
V = volume (mL) di campione sottoposto ad analisi.

8.2 Solidi fissi

Il contenuto di solidi fissi è dato da:

$$\text{Solidi fissi (mg/L)} = \frac{(M_1 - M_0)\cdot 1000}{V}$$

dove:
M_1 = peso (mg) del residuo + peso (mg) della capsula o del filtro dopo l'incenerimento;
M_0 = peso (mg) della capsula o del filtro dopo l'incenerimento;
V = volume (mL) di campione sottoposto ad analisi.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods far the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed. (Washington, APHA), 2-54/2-59.

2100. Temperatura

La misura della temperatura consente di controllare il problema dell'inquinamento conseguente all'immissione di energia termica nei corpi idrici.
A differenza di altri parametri la normativa prevede oltre ad un limite all'effuente, un limite all'incremento di temperatura (ΔT) nel corpo idrico ricevente.
Dopo aver descritto modalità e apparecchiature per l'effettuazione delle misure di temperatura si riporta in appendice la metodologia per il calcolo dell'incremento termico in acque di mare.

1. Principio del metodo

La temperatura dell'acqua si misura immergendo l'elemento sensibile dello strumento e attendendo il raggiungimento dell'equilibrio termico prima di effettuare la lettura.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ad acque naturali e di scarico, con alcune prescrizioni per particolari situazioni.

3. Interferenze e cause di errore

Il metodo è esente da interferenze.

4. Campionamento e conservazione del campione

La misura della temperatura deve essere effettuata all'atto del prelievo.

5. Reattivi

Il metodo non prevede l'uso dei reattivi.

6. Apparecchiature

6.1 Apparecchiature per uso comune

6.1.1 Termometro, scala Celsius, graduato 1/10 di °C.

6.1.2 Termometro a pozzetto, scala Celsius, (Fig. 1a).

6.2 Apparecchiature per usi particolari

6.2.1 Termometro a rovesciamento (Fig. 1b).

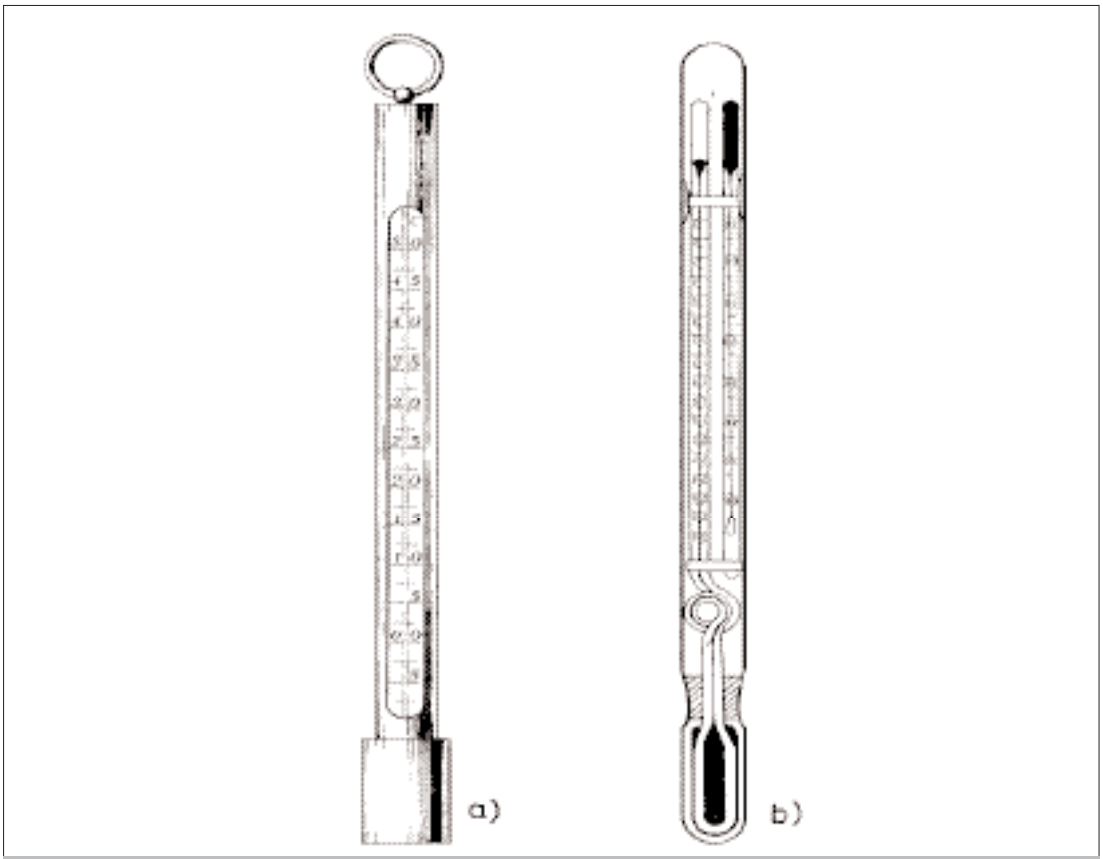


Figura 1: a) Termometro a pozzetto; b) Termometro a rovesciamento.

6.2.2 Termistori.

7. Procedimento

E' opportuno controllare all'inizio dell'uso e poi periodicamente la strumentazione di misura, eseguendo prove di comparazione in parallelo con un termometro di precisione munito di certificato di garanzia.

7.1 Applicazioni generali

7.1.1 Misura con termometro a mercurio

Per eseguire la misura della temperatura immergere il bulbo del termometro e parte della colonna termometrica nell'acqua attendendo il raggiungimento dell'equilibrio termico; a questo punto effettuare la lettura.

7.1.2 Misura con termometro a pozzetto

Nel caso in cui il prelievo del campione venga eseguito su acque cui si può accedere con difficoltà, si può ricorrere al termometro a pozzetto (Fig. 1a). Esso è costituito da un termometro fissato all'interno di un'armatura metallica terminante in un bicchierino metallico (pozzetto) in cui pesca il bulbo. Il termometro viene generalmente calato in acqua appeso ad una cordicella. Durante l'immersione, dato che il termometro è opportunamente zavorrato, il bicchierino si riempie d'acqua, permettendo quindi la determinazione della temperatura una volta estratto lo strumento dall'acqua in esame, senza che la misura venga perturbata per il tempo intercorrente per il recupero dello strumento e la

lettura della temperatura. Per la taratura vale quanto specificato per il termometro a mercurio (7.1.1).

7.2 Applicazioni particolari

Per misure di temperatura a varie profondità, come è spesso richiesto in ricerche limnologiche si fa uso di termometri elettrici e termistori, nonché di termometri a rovesciamento (Fig. 1b).

7.2.1 Misura con termometro a rovesciamento

Questo termometro ha un serbatoio di mercurio relativamente grande che è collegato mediante un sottile capillare ad un bulbo più piccolo (Fig. 1b). Appena al di sopra del serbatoio, il capillare presenta una strozzatura ed una piccola ramificazione, si avvita quindi a spirale per poi procedere in linea retta fino al bulbo superiore. Quando il termometro è in posizione diritta, il volume occupato dal mercurio, al di sopra della strozzatura, è funzione della temperatura. Quando il termometro viene rovesciato la colonna di mercurio si interrompe e la quantità rimasta nella parte superiore va ad occupare il bulbo piccolo e parte della colonna di mercurio graduata. L'altezza della colonna di mercurio indica la temperatura dell'acqua al momento del rovesciamento.
Il termometro ausiliario montato a fianco del termometro a rovesciamento serve a misurare la temperatura dell'ambiente, una volta riportato il termometro in superficie. Questa misura serve ad apportare le opportune correzioni al valore letto sul termometro a rovesciamento per mezzo della seguente relazione:

$$\delta T = \left[\frac{(T'-t)(T'+V_0)}{K}\right]\left[1+\frac{(T'-t)(T'+V_0)}{K}\right]+L$$

dove:
δT = correzione da sommare algebricamente alla lettura effettuata (T');
T' = temperatura misurata con il termometro a rovesciamento;
t = temperatura misurata con il termometro ausiliario nel momento in cui viene effettuata la lettura T';
V_0 = volume del piccolo bulbo, all'estremità del capillare, fino alla gradazione di 0°C (vedi istruzioni della Casa fornitrice dello strumento);
K = costante dipendente dal coefficiente di espansione termica del mercurio e del vetro. Il valore, comunemente adottato, è K=6100;
L = valore della correzione, dipendente da T' da apportare alla taratura del termometro (vedi istruzioni della Casa fornitrice dello strumento);

Effettuare una serie di misure e riportare su un grafico δT in funzione di T', a diversi valori di t costante.

7.2.2 Termistori

Nei dispositivi a termistori l'elemento sensibile è una resistenza il cui coefficiente di temperatura, di segno negativo, è molto elevato (in media circa il 4,4% per grado centigrado a 25°C). La resistenza del termistore è misurata in modo diretto mediante un ponte di Wheatstone; da tale valore si risale alla temperatura mediante un grafico di taratura resistenza/temperatura. La taratura di un termistore si esegue ponendo il dispositivo in un termostato ad acqua, a temperatura regolabile, ed immergendo nello stesso termostato un termometro tarato al decimo di grado; si esegue quindi la lettura della resistenza a varie temperature.
Per eseguire la misura della temperatura in un corpo idrico a varie profondità, il termistore è collegato ad un cavo su cui si segnano le distanze in metri. Si cala quindi il cavo e si annotano o registrano i valori misurati alle varie profondità dopo che è stato raggiunto l'equilibrio termico per ogni posizione. E' conveniente eseguire la misura sia in discesa che in risalita.

8. Calcoli

Tutti i risultati sia ottenuti dalla lettura diretta di un termometro a mercurio che dal grafico di taratura di un termometro a termistore, vengono espressi in gradi e decimi di grado della scala Celsius.

9. Qualità del dato

Per strumenti aventi sensibilità pari a 1/10°C, la precisione è ±0,1°C.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA WEF (1998): "*Standard Methods for Examination of Water and Wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA).

APPENDICE - Metodologia per il calcolo dell'incremento termico in acqua di mare (D.L. n. 408 del 9 Ottobre 1993)

L'incremento termico viene determinato come differenza fra i valori superficiali di temperatura misurati a 1000 metri dallo scarico e quello di un punto o di una porzione di corpo idrico non influenzato dallo scarico stesso.
Ai fini della verifica dell'incremento termico procedere nel modo seguente:

- definire la circonferenza (nel caso di scarichi attraverso condotte) o l'arco di circonferenza (nel caso di scarichi dalla costa) di raggio 1000 metri e centro nel punto corrispondente alla sezione di scarico (punto di scarico);
- effettuare le misure di temperatura nello strato superficiale, alla quota di –0,1 m, ad intervalli regolari lungo la circonferenza o l'arco di circonferenza precedentemente definiti. Quanto minore è l'intervallo fra i punti, tanto più significativa è l'informazione che si ottiene; in generale è stato verificato che determinazioni effettuate ad intervalli angolari di 5° (cui corrisponde un arco di lunghezza pari a circa 90 metri) consentono di evidenziare il valore massimo di temperatura raggiunto dal corpo idrico ricevente a 1000 metri dallo scarico termico.
- definire un punto esterno all'arco e rappresentativo delle condizioni medie, non perturbate, del corpo ricettore. La scelta di tale punto va effettuata, caso per caso, sulla base di dati raccolti prima dell'entrata in funzione dello scarico o a scarico non in esercizio.

Qualora non sia possibile definire un punto esterno all'arco e rappresentativo delle condizioni non perturbate, si può assumere come temperatura riferimento (T_R) la media delle temperature superficiali (T_m), misurate alla quota di -0,1 m, dei tre punti più freddi del predetto arco aumentata del doppio dello scarto tipo relativo ai suddetti tre punti (Fig. 2) secondo la relazione seguente:

$$T_R = T_m + 2s$$

Lo scarto tipo relativo alle misure dei tre punti più freddi può essere calcolato utilizzando la seguente formula:

$$s = \sqrt{\frac{(T_1 - T_m) + (T_2 - T_m) + (T_3 - T_m)^2}{2}}$$

dove:
s = scarto tipo;
T_m = temperatura media dei tre punti più freddi dell'arco;
$T_{1,2,3}$ = temperature superficiali dei tre punti più freddi dell'arco.

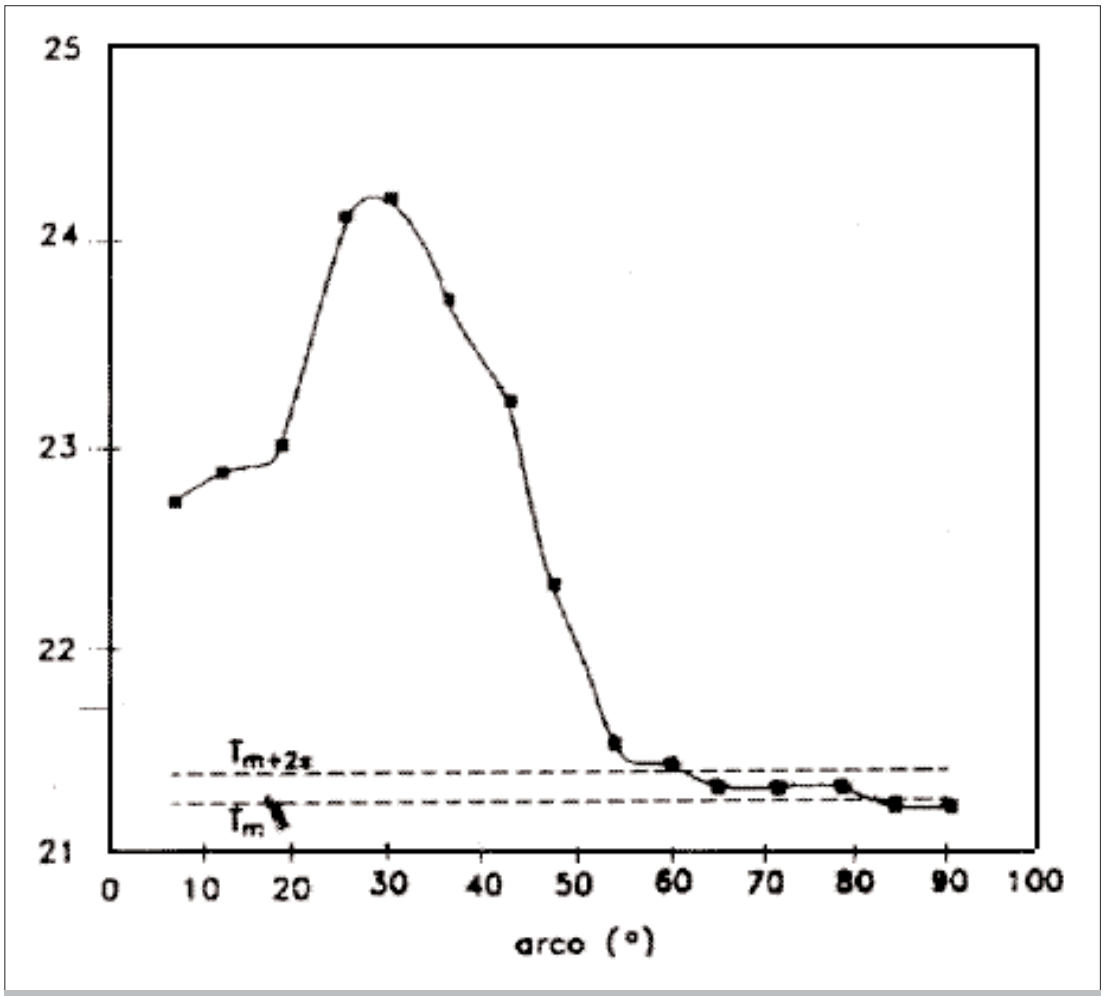


Figura 2: Individuazione della temperatura di riferimento.

- effettuare una serie ripetuta di n misure di temperatura (almeno 10), alla quota di – 0,1 metri nell'intorno del punto della circonferenza o dell'arco di circonferenza caratterizzato dalla temperatura massima e nel punto di riferimento.
- calcolare i relativi scarti tipo utilizzando le seguenti formule:

$$s_1 = \sqrt{\frac{\sum_1^n i(T_i - T_M)^2}{n-1}}$$

$$s_2 = \sqrt{\frac{\sum_1^n i(T_m - T_{M1})^2}{n-1}}$$

dove:
s_1 = scarto tipo relativo alle repliche nel punto più caldo;
T_i = temperatura della singola replica nel punto più caldo;
T_M = valore medio di temperatura relativo alle n repliche nel punto più caldo;
s_2 = scarto tipo relativo alle repliche nel punto di riferimento;
T_{ri} = temperatura della singola replica nel punto di riferimento;
T_{rM} = valore medio di temperatura relativo alle n repliche nel punto di riferimento.

- determinare la differenza di temperatura tra ciascun punto dell'arco e il punto di riferimento nel modo seguente:

$$\Delta T_j = (T_j - 2s_1) - (T_{rM} + 2s_2)$$

dove:
ΔT_J = incremento termico in ciascun punto;
T_J = temperatura misurata sulla circonferenza o sull'arco di circonferenza a 1000 metri;
T_{rM} = valore medio di temperatura relativo alle n repliche nel punto di riferimento.

La correzione dell'incremento termico consente di fissare un livello di probabilità sulle misure effettuate sufficientemente elevato (superiore al 90%) tale da garantire che il suddetto incremento non superi i valori indicati come standard di qualità a seguito di errori casuali.
Nel caso in cui venga assunta come temperatura di riferimento la media delle temperature superficiali dei tre punti più freddi dell'arco l'incremento termico relativo a ciascun punto si calcola nel modo seguente:

$$\Delta T_j = (T_j - 2s_1) - T_R$$

2110. Torbidità

Il primo metodo sviluppato per misurare la torbidità in acque di scarico, superficiali e potabili, si basa sulla misura dell'altezza della colonna di campione, contenuto in speciali cilindri graduati, che è giusto sufficiente a far scomparire l'immagine della fiamma di una candela "standard" osservata verticalmente attraverso lo stesso (turbidimetro a candela di Jackson). Un'altezza della colonna pari a 21,5 cm è stata assunta pari a 100 unità di torbidità Jackson (JTU) o a 100 JCU (Jackson Candle Unit). Il metodo è applicabile solo per torbidità superiori a 25 JTU. Tale limitazione, importante soprattutto nel campo delle acque potabili, ha portato a sviluppare metodi alternativi, sia basati sulla torbidimetria, utilizzando sorgenti elettriche di luce, specchi ottici, fotomoltiplicatori, ecc., che sulla nefelometria.
Benchè non esista una precisa correlazione lineare tra le misure effettuate con torbidimetro a candela di Jackson e le misure nefelometriche, in quanto i due tipi di misura si basano su principi ottici diversi, si è visto che una specifica sospensione di formazina, definita come 40 unità nefelometriche di torbidità (NTU), o 40 unità torbidimetriche di formazina (FTU), quando viene misurata con un torbidimetro a candela presenta una torbidità pari a circa 40 JTU.
Ne discende quindi che le varie unità di misura (NTU, FTU, JTU e JCU) rappresentano con buona approssimazione lo stesso grado di torbidità, anche se, per quanto detto sopra, è bene specificare nel rapporto di analisi il metodo seguito.

1. Principio del metodo

Si definisce col termine di torbidità la riduzione della trasparenza di un campione, dovuta alla presenza di sostanze in sospensione.
La torbidità rappresenta una misura aspecifica della concentrazione in peso dei solidi sospesi nel campione; non è tuttavia possibile stabilire una correlazione diretta tra queste due variabili, in quanto le proprietà ottiche di una sospensione risultano influenzate, oltre che dalla quantità, anche dalla forma, dalle dimensioni e dall'indice di rifrazione delle particelle sospese, nonchè dalla lunghezza d'onda del raggio incidente.
Quando un fascio di luce attraversa una soluzione incolore che presenti in sospensione una fase finemente dispersa, si hanno i seguenti effetti:

- la luce viene assorbita, per cui l'intensità del raggio trasmesso risulta inferiore a quella del raggio incidente;
- la luce, per fenomeni di riflessione e rifrazione (effetto Tyndall), viene diffusa dalle particelle in sospensione.

Il prevalere di un effetto sull'altro dipende tra l'altro dalle dimensioni delle particelle disperse: in caso di dispersioni non molto fini prevale il fenomeno dell'assorbimento, viceversa con fasi disperse estremamente fini prevale il fenomeno della diffusione.
Coesistendo comunque entrambi i fenomeni, la torbidità può dunque essere determinata o valutando l'entità dell'assorbimento prodotto dalla fase dispersa sul fascio incidente ed in tal caso la misura viene condotta nella stessa direzione del raggio incidente, utilizzando un normale spettrofotometro (metodo Torbidimetrico), oppure valutando l'entità della luce diffusa, misurata a 90° rispetto a quella incidente (metodo Nefelometrico).
Lo schema riportato in Fig. 1 mostra la diversità di applicazione strumentale tra le misure torbidimetriche e quelle nefelometriche.
La misura torbidimetrica è riconducibile nell'ambito di applicazione della legge di Lambert-

Beer, esistendo, almeno in un certo intervallo di concentrazione, una relazione quasi lineare tra la luce assorbita e la torbidità dovuta alla quantità di sostanza sospesa.

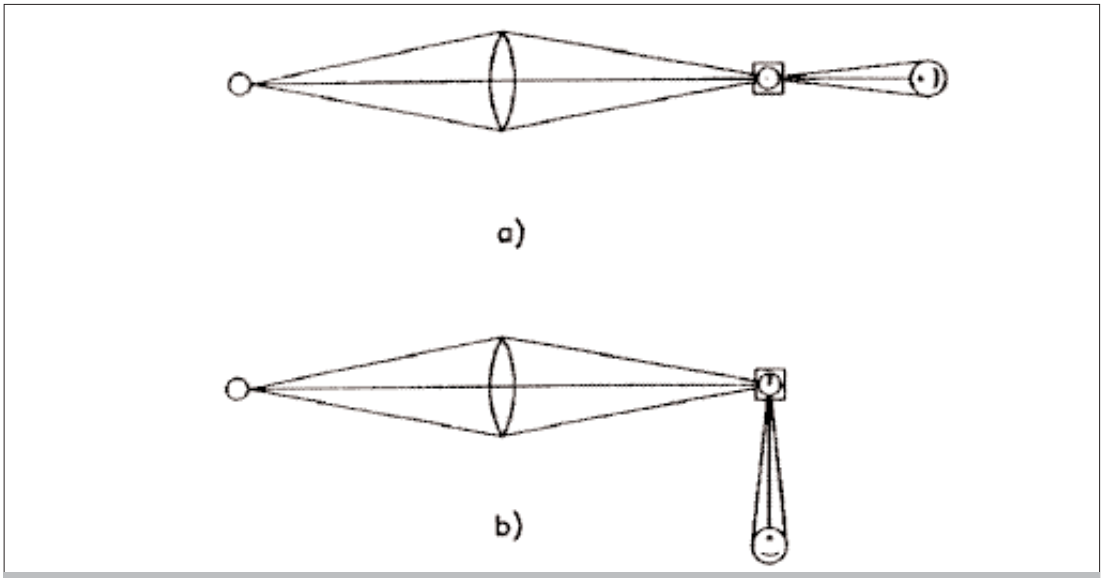


Figura 1: a) schema di torbidimetro; b) schema di nefelometro.

2. Campo di applicazione

I metodi sono applicabili alle acque potabili, superficiali e di scarico. L'intervallo di misura è correlato a diverse variabili, quali: lo strumento utilizzato (spettrofotometro o nefelometro), la lunghezza del cammino ottico delle celle portacampione, la sospensione di riferimento utilizzata (silice o formazina), cioè l'unità di misura utilizzata per l'espressione del valore di torbidità. Con un normale spettrofotometro, utilizzando una cella da 50 mm, l'intervallo di misura va da 1 a 100 mg/L SiO_2 e da 0,4 a 40 unità di formazina (NTU, FTU, JTU, JCU).
Il nefelometro viene sempre tarato in unità di formazina e le case costruttrici danno più intervalli di applicabilità (es. 0-2 NTU; 0-20 NTU; 0-200 NTU).

3. Interferenze e cause di errore

La presenza nel campione in esame di particelle sospese di più grosse dimensioni può causare improvvisi aumenti nella lettura della torbidità, a causa della loro continua fluttuazione dentro e fuori il raggio di luce incidente. Per compensare tali deviazioni può essere determinato il valore medio oppure, in presenza di rare particelle anomale, disaggregare i relativi picchi di lettura.
La presenza di bolle d'aria, sia in sospensione che aderenti alle pareti della cella, causa errori in eccesso, specialmente ai più bassi valori di torbidità. Tale interferenza può essere eliminata degasando il campione sotto leggero vuoto (metodo che presenta le minori possibilità di alterazione del campione), oppure aggiungendo nella cella di lettura, prima del suo riempimento, una goccia di soluzione di Triton X-100 o ricorrendo ad altri metodi (degasamento con bagno ad ultrasuoni a bassa energia, debole riscaldamento, ecc.).
Altra interferenza è causata dalla colorazione del campione, dovuta a sostanze disciolte che assorbono la luce.
Frequenti cause di errore sono la non perfetta pulizia della cella di misura (presenza di polvere, impronte digitali, graffiature, ecc.) o imperfezioni del vetro. Un leggero strato di olio di silicone applicato e strofinato sulla superficie esterna in modo da ottenere un film uniforme evita il depositarsi di polvere e minimizza gli effetti delle graffiature o altre piccole imperfe-

zioni del vetro. Costituiscono causa di errore anche le vibrazioni che disturbano visibilmente la superficie libera del campione.
In ambiente umido o quando si effettuano misurazioni con campioni troppo freddi si può verificare un appannamento della parete esterna della cella, con conseguente falso incremento della torbidità.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il prelievo deve essere effettuato in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".
La torbidità va determinata nello stesso giorno del campionamento. Qualora ciò non fosse possibile, conservare il campione al buio fino a 24 ore. Non conservare per tempi più lunghi in quanto possono verificarsi variazioni irreversibili che modificano la torbidità. Prima della misura, agitare vigorosamente il campione.

5. Apparecchiature

5.1 *Spettrofotometro* che consenta di eseguire misure fra 400 e 460 nm, con portacelle e celle di lunghezza variabile da 20 a 100 mm.

5.2 *Nefelometro* con campi di misura multipli (es. 0-2; 0-20; 0-200 NTU).

La sensibilità dello strumento deve permettere una misura di torbidità che apprezzi differenze di 0,02 NTU o meno in un campione di acqua avente torbidità inferiore a 1 NTU.

5.3 *Normale vetreria da laboratorio* per la preparazione e conservazione delle sospensioni di riferimento.

5.4 *Sistema di filtrazione sottovuoto*

5.5 *Agitatore vibrazionale o rotazionale* per matracci e bottiglie.

5.6 *Filtri*, porosità 0,2 µm.

5.7 *Serie di cilindri*, in vetro, di uguale capacità, forma e trasparenza ottica.

6. Reattivi

6.1 *Acqua esente da torbidità* (<0,02 NTU).

Si può preparare in laboratorio facendo passare l'acqua distillata attraverso un filtro a porosità 0,2 µm, risciacquando almeno due volte con l'acqua filtrata il contenitore di raccolta e scartando i primi 200 mL.

6.2 *Sospensione di riferimento concentrata di formazina (400 NTU)*

- Soluzione I: in un matraccio tarato da 100 mL sciogliere 1 g di solfato di idrazina, $(NH_2)_2H_2SO_4$, in 80 mL di acqua esente da torbidità (6.1); tenere in agitazione per 4 ore, quindi portare a volume.

  Nota: *il solfato di idrazina è classificato R45 (cancerogeno); si raccomanda quindi di eseguire tutte le manipolazioni sotto cappa ben ventilata evitando qualsiasi contatto, inalazione o ingestione.*

- Soluzione II: in un matraccio tarato da 100 mL sciogliere 10 g di esametilentetrammina, $(CH_2)_6N_4$, in 80 mL di acqua esente da torbidità (6.1); tenere in agitazione per 4 ore, quindi portare a volume.

In un matraccio tarato da 100 mL trasferire 5 mL della Soluzione I e 5 mL della Soluzione II e miscelare bene. Lasciare a riposo per 24 ore a 25±3°C e quindi portare a volume. Soluzioni e sospensione sono stabili per un mese.

6.3 Sospensione di riferimento diluita di formazina (40 NTU)

In un matraccio tarato da 100 mL trasferire 10 mL di sospensione di riferimento concentrata di formazina (6.2) e portare a volume con acqua esente da torbidità (6.1). Questa sospensione va preparata giornalmente.

6.4 Sospensione di riferimento di silice (100 mg/L SiO_2)

Aggiungere circa 5 g di farina fossile ad 1 litro di acqua distillata in un cilindro graduato, agitare ripetutamente e a più riprese; lasciare a riposo la sospensione per il tempo necessario alla sedimentazione della frazione più pesante (da 2 a 24 ore in funzione della granulometria della farina fossile impiegata: 2 ore con il 98% di granulometria <0,1 mm; 24 ore con granulometria <0,04 mm). Evitando di disturbare il sedimento, trasferire per sifonamento in un altro contenitore di vetro la sospensione supernatante. Il titolo di tale sospensione si determina evaporando una quantità esattamente misurata (50 o 100 mL) ed essiccando a 110°C fino a peso costante. Con opportune diluizioni è così possibile preparare una sospensione di riferimento base pari a 100 mg/L SiO_2. Questa sospensione di riferimento si mantiene inalterata per circa 3 mesi, previa aggiunta di una goccia di soluzione satura di $HgCl_2$.

7. Procedimento

7.1 Preparazione delle sospensioni di confronto e/o taratura

Si preparano diluendo le sospensioni di riferimento base con acqua esente da torbidità (6.1).

7.1.1 Sospensioni in unità di formazina (NTU)

Preparare in matracci tarati da 100 mL una serie di sospensioni aventi torbidità 0,8 NTU; 2,0 NTU; 4,0 NTU; 8,0 NTU; 10,0 NTU; 20,0 NTU e 40,0 NTU prelevando rispettivamente 2 mL, 5 mL, 10 mL, 20 mL, 25 mL, 50 mL e 100 mL della sospensione di riferimento diluita di formazina (6.3) e portando a volume con acqua esente da torbidità (6.1). In un matraccio tarato da 100 mL, che fungerà da bianco, trasferire 100 mL di acqua esente da torbidità (6.1).

7.1.2 Sospensione di silice (SiO_2 mg/L)

Preparare in matracci tarati da 100 mL una serie di sospensioni aventi torbidità 2 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 25 mg/L, 50 mg/L e 100 mg/L SiO_2 prelevando rispettivamente 2 mL, 5 mL, 10 mL, 20 mL, 25 mL, 50 mL e 100 mL della sospensione di riferimento base di silice (6.4) e portando a volume con acqua esente da torbidità (6.1). In un matraccio tarato da 100 mL, che fungerà da bianco, trasferire 100 mL di acqua esente da torbidità (6.1).

7.2 Determinazione

La determinazione può essere fatta per confronto visuale con le sospensioni 7.1.1 o 7.1.2 o con metodo strumentale (spettrofotometrico o nefelometrico), effettuando preventivamente la taratura con le citate sospensioni.

7.2.1 Determinazione visuale

Trasferire le sospensioni di confronto nei cilindri di uguale capacità e forma (5.7), assicurandosi che il liquido abbia in tutti lo stesso livello; si deve aver cura nei travasi di rimescolare bene in modo da omogeneizzare le sospensioni. Trasferire quindi il liquido da esaminare, ugualmente ben rimescolato, in un altro cilindro, perfettamente identico a quelli in cui sono state poste le sospensioni di confronto. Il livello del liquido nel cilindro deve essere identico a quello delle sospensioni di confronto. Paragonare la torbidità del campione in esame con quella delle sospensioni di confronto a torbidità nota. Se la torbidità del liquido in esame è superiore al più elevato valore di torbidità delle sospensioni di confronto, è opportuno diluirlo fino a rientrare nei limiti; se essa ha un valore intermedio a due sospensioni di confronto, preparare, a partire dalla sospensione di rifernimento di base, altre sospensioni con torbidità compresa tra i valori delle due suddette sospensioni. L'apprezzamento va fatto osservando la sospensione dall'alto, sull'asse del cilindro, contro una superficie bianca, possibilmente alla luce del giorno o con luce bianca diffusa.

7.2.2 Determinazione strumentale

Sospensioni di riferimento e campioni vanno vigorosamente agitati prima di ciascuna misura.(*)

7.2.2.A Metodo torbidimetrico

Misurare l'assorbanza delle sospensioni di riferimento (7.1.1) o (7.1.2) alla lunghezza d'onda di 440 nm. Tracciare il grafico di taratura ponendo in ascissa i valori di torbidità nell'unità prescelta (NTU o mg/L SiO_2) e in ordinata i valori di assorbanza, sottratti del bianco.
Misurare quindi l'assorbanza del campione in esame e determinare il valore di torbidità dal grafico di taratura precedentemente tracciato.

7.2.2.B Metodo nefelometrico

Predisporre lo strumento per la lettura seguendo le istruzioni riportate nel manuale d'uso dello strumento.
Selezionare il "range" di misura desiderato (se questo non è noto, selezionare in prima approssimazione il più elevato; si selezionerà poi il più basso possibile in rapporto alla torbidità da misurare). Inserire successivamente nell'apparecchio di misura le sospensioni di confronto (7.1.1 o 7.1.2) ed il campione in esame, utilizzando possibilmente sempre la stessa cella di misura (si elimina così l'errore dovuto alle variazioni ottiche fra diverse celle). Con le letture effettuate costruire il grafico, riportando sulle ascisse i valori delle unità nefelometriche prescelte e sulle ordinate la corrispondente risposta strumentale. La torbidità del campione in esame viene ricavata dal grafico di taratura. Qualora lo strumento dia letture direttamente in NTU è comunque necessaria la sua periodica taratura con le sospensioni di riferimento (7.1.1) od altre preparate in modo analogo partendo dalle sospensioni di riferimento di formazina (6.2) o (6.3).

8. Calcoli

La torbidità si esprime in unità di formazina (NTU=FTU~JTU=JCU) oppure in unità di silice (mg/L di SiO_2), in base ai risultati della determinazione visuale (7.2.1) o strumentale (7.2.2).
Si deve tener conto dell'eventuale diluizione operata sul campione, mediante la formula:

$$C = \frac{c \cdot (A + B)}{B}$$

dove:
C = torbidità sul campione tal quale;

(*) In caso di campioni con torbidità superiore a 100 mg/L SiO_2 o a 40 NTU è necessario diluirli con uno o più volumi di acqua esente da torbidità fino a farli rientrare nel campo di applicazione del metodo.

c = torbidità rilevata sul campione diluito;
A = mL acqua di diluizione;
B = mL di campione prelevati per la diluizione.

Il fattore di conversione tra l'unità di silice (mg/L SiO_2) e l'unità di formazina (NTU, FTU, JTU, JCU) fissato nel D.P.R. 236/88, concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano, è pari a 0,4 (1 unità di silice = 0,4 unità di formazina). Poichè tuttavia tale fattore può variare in relazione allo strumento utilizzato, è opportuno che per ciascun strumento venga ricavato sperimentalmente il fattore di conversione, effettuando la taratura sia con la sospensione di formazina (7.1.1), che con quello di silice (7.1.2). Il fattore di conversione è dato dal rapporto tra i coefficienti angolari delle rette di taratura:

$$\text{Unità di silice} = \text{Unità di formazina} \times \frac{K_1}{K_2}$$

dove:

K_1 = coefficente angolare retta di taratura con silice;
K_2 = coefficiente angolare retta di taratura con formazina.

9. Qualità del dato

Precisione ed esattezza variano in funzione del materiale utilizzato per la taratura (tipo di sospensione e strumento).
Con il nefelometro ed utilizzando la sospensione di riferimento di formazina le case produttrici danno una esattezza ed una ripetibilità rispettivamente del ±2% e del ±1% sul fondo scala, oltre a ±1 unità sull'ultima cifra significativa. Altri autori, per il metodo torbidimetrico, danno valori di precisione variabili tra il 5% e il 10%.
Approssimando i valori dell'ultima cifra significativa secondo le indicazioni riportate in Tab. 1, la differenza nella misura di torbidità su uno stesso campione effettuata da più laboratori sarà più contenuta dell'approssimazione data.

Tabella 1: Approssimazione delle misure di torbidità in funzione dell'intervallo di misura

Range di torbidità		Approssimazione	
NTU	mg/L SiO_2	NTU	mg/L SiO_3
0-2,0	1,0-5	0,1	0,5
2,0-20	5-25	0,5	1
20-200	25-100	5	5
200-400	100-200	10	10
400-1000	200-1000	50	50
>1000	>1000	100	100

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA) 2-8/2-11.

ASTM (1980): "*Annual Book of ASTM Standards*", Part. 31, D1889-71 (Philadelphia).

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ (1997): "*Metodi per le acque destinate al consumo umano*", Rapporti ISTISAN 97/8, 11-14.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (1984): "*Guidelines far Drinking Water Quality*", Vol. 2, (Geneva, WHO), 307-310.

2120. Trasparenza

Introduzione

La trasparenza dell'acqua fornisce una valutazione della densità del materiale sospeso, sia di origine biotica che abiotica. Il parametro ha un valore prevalentemente comparativo tra ambienti e stagioni ed è di supporto ad altre informazioni sulla qualità delle acque. Il metodo più antico per la determinazione della trasparenza, ed anche il più semplice, è basato sulla misura della profondità di scomparsa del cosiddetto "disco del Secchi", dal nome dell'abate astronomo Angelo Secchi che lo propose nel 1865. Il metodo è ampiamente adottato ed accompagna comunemente le determinazioni più sofisticate nel campo dell'idrologia fisica e biologica.

1. Principio del metodo

La misura della trasparenza di un'acqua si basa sulla valutazione della distanza alla quale un disco laccato in bianco, immerso in detta acqua, scompare dalla vista dell'operatore.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ad acque naturali, sia dolci che saline.

3. Interferenze e cause d'errore

Prendendo le opportune precauzioni, quale la riduzione al minimo degli effetti di riflessione, non dovrebbero sussistere interferenze degne di nota.

4. Campionamento e conservazione del campione

Trattandosi di una misura che si effettua direttamente nel corpo idrico non è richiesto il campionamento.

5. Apparecchiatura

5.1 Disco di Secchi

Preparare un disco di 30 cm di diametro, preferibilmente in metallo (lamierino da 1 mm circa di spessore) e verniciarlo in bianco. Al centro del disco dovranno essere collocati 2 anelli, uno nella faccia superiore e uno in quella inferiore.
Al primo dovrà essere legata una fune graduata (ogni 10 cm per i primi 5 metri e ogni 50 cm per i metri successivi); al secondo dovrà essere attaccato un peso per favorire la discesa in verticale del disco. La fune dovrà essere lunga non meno di 30 m.

6. Reattivi

Il metodo non prevede l'impiego di reattivi.

7. Procedimento

Il disco viene immerso nell'acqua tenendolo con la fune metrata. Lo si lascia scendere fino a che scompare e si nota la profondità di scomparsa; quindi lo si fa risalire fino a che ricompare e si nota anche questa seconda profondità. La media tra le due profondità corrisponde al limite di visibilità espresso in metri e decimali.
L'operazione va effettuata sul lato ombreggiato dell'imbarcazione mantenendo tra l'osservatore e l'acqua una distanza costante.
È consigliabile che durante la misura vi sia una buona illuminazione (cielo sereno, sole in verticale) ed un moto ondoso ridotto al minimo. Quando queste condizioni non esistono, la misura potrà essere eseguita ugualmente purché venga annotata la situazione del momento.
Occorre tenere presente che qualora l'asse operatore-disco non sia perpendicolare alla superficie del mare bisogna misurare l'angolo α formato da detto asse con la perpendicolare stessa e utilizzare la seguente relazione:

$$l = l_o \cdot \cos \alpha$$

dove:
l = misura della trasparenza corretta;
l_o = misura della trasparenza ottenuta sperimentalmente;
α = angolo compreso tra l e l_o.

8. Calcoli

La trasparenza, misurata direttamente, viene espressa in metri e decimali.

9. Qualità del dato

La stima della precisione o dell'esattezza è molto difficile, in quanto dipende dall'operatore e dalle condizioni di luce.

BIBLIOGRAFIA

SUESS M.J. (1982): "*Examination of water for pollution control*", WHO/Pergamon Press.

ZAVODNIK D. (1982): "*Manual of the methodologies adopted for the coordinated Yugoslav-Italian research in the north Adriatic sea*", Rovinj, March 1982.

3000 - METALLI E SPECIE METALLICHE

Nelle sezioni seguenti sono descritti i metodi per la determinazione di specie metalliche; sono inclusi anche alcuni elementi (come ad esempio il boro) i quali non possono essere propriamente considerati metalli. Nel caso dei metalli, con alcune eccezioni per metalli alcalini e alcalino terrosi e tellurio il protocollo analitico è preceduto da informazioni sintetiche su fonti di generazioni, livelli di concentrazione e criteri di qualità.
I metodi per la determinazione dei metalli prevedono l'impiego di diverse tecniche:

- spettrofotometria di assorbimento atomico in fiamma;
- spettrofotometria di assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica;
- spettrofotometria di assorbimento atomico con formazione di idruri;
- spettrometria di emissione con sorgente al plasma;
- spettrofotometria di assorbimento molecolare nel visibile;
- cromatografia ionica.

Tutte queste tecniche sono ampiamente descritte nella parte generale (Sezione 1020).
Sempre nella parte generale sono indicati metodi di campionamento e di conservazione del campione (Sezione 1030).
I metalli possono essere presenti sia nella fase liquida sia nella fase solida; pur non essendoci nella realtà separazioni nette tra disciolto e particolato, ma piuttosto un "continuo" di dimensioni molecolari, nella pratica si sono adottate per convenzione le seguenti definizioni:

- metallo disciolto: il metallo presente nella fase liquida di un campione non acidificato passato attraverso un filtro avente una porosità di 0,45 μm;
- metallo sospeso (o in sospensione): il metallo presente nella fase solida di un campione non acidificato trattenuta da un filtro avente porosità di 0,45 μm;
- metallo totale: la somma delle concentrazioni del metallo disciolto e del metallo sospeso;
- metallo estraibile con acido: la concentrazione di metallo in soluzione dopo trattamento di un campione non filtrato con acido. Questo trattamento può essere più o meno forte, secondo lo scopo delle indagini; ovviamente quanto più il trattamento è forte, tanto più la concentrazione del metallo estraibile con acido diventa prossima alla concentrazione del metallo totale.

Esistono molte raccomandazioni sull'uso in sicurezza di strumentazione analitica e di reattivi di laboratorio. Data la diversità di tipologie e modelli di strumenti e l'elevato numero di reattivi utilizzati nei singoli metodi proposti in questa parte del manuale, non è possibile in questa sede operare una lista di tutte le possibili avvertenze. Pertanto, si rimanda alla consultazione dei manuali d'uso dei singoli strumenti e delle schede di sicurezza dei singoli reattivi, nonché alla lettura delle frasi di rischio riportate sulle etichette degli imballaggi delle sostanze e preparati utilizzati.
Solo per alcuni casi particolari si è provveduto ad esplicitare, all'interno del singolo metodo, particolari avvertenze sulla sicurezza d'uso della strumentazione e dei reattivi.
Comunque tutte le operazioni analitiche devono essere effettuate nel rispetto delle disposizioni stabilite dalla normativa sulla sicurezza nei luoghi di lavoro.

3010. Trattamento preliminare dei campioni per l'analisi dei metalli mediante mineralizzazione acida

METODO A - Mineralizzazione acida convenzionale

1. Principio del metodo

Il metodo consiste in una digestione con acido concentrato a caldo in recipienti chiusi in stufa (o aperti sotto cappa) di campioni acquosi tal quali per portare in soluzione i metalli associati al particolato o presenti in forma colloidale e/o organica. La digestione di campioni acquosi tal quali, che può avvenire con modalità più o meno drastiche, dà una stima del metallo totale, che è funzione oltre che delle condizioni sperimentali anche delle proprietà specifiche del metallo.
I metalli totali così ottenuti possono essere analizzati con spettrometria di emissione in sorgente plasma (ICP-OES) o spettrometria di assorbimento atomico (in fiamma, mediante atomizzazione elettrotermica, mediante formazione di idruri).

2. Interferenze e cause di errore

Si consiglia di utilizzare il metodo di digestione meno forte, che garantisca un recupero completo e compatibile con le tecniche analitiche da utilizzare a seconda del metallo in esame. La digestione con acido nitrico è la più adeguata per la maggior parte dei campioni e il nitrato costituisce una buona matrice per le diverse tecniche analitiche (ETA-AAS, F-AAS).
Alcuni campioni richiedono l'aggiunta di altri acidi (perclorico, cloridrico, solforico, fluoridrico) per una digestione più efficace. Poiché questi acidi possono interferire nell'analisi di alcuni metalli o costituire una scadente matrice per l'analisi, è necessario verificare la percentuale di recupero dei metalli per ogni procedura di digestione utilizzata.
In generale la digestione con il solo acido nitrico è consigliata per campioni scarsamente inquinati o per composti facilmente ossidabili, la miscela HNO_3-H_2SO_4 o HNO_3-HCl per la sostanza organica facilmente ossidabile; la miscela HNO_3-$HClO_4$ o HNO_3-$HClO_4$-HF è necessaria per mineralizzare la sostanza organica refrattaria o i minerali (ad esempio silice). Attualmente la tendenza è di utilizzare acido nitrico e cloridrico, od anche la miscela tra i due (acqua regia 1:3 v/v HNO_3-HCl), mentre si tende a sconsigliare l'uso dell'acido perclorico per i rischi connessi con possibili esplosioni, e ad utilizzare l'acido fluoridrico in aggiunta ad altri acidi, quando necessario, facendo particolare attenzione nel maneggiarlo e indossando le protezioni necessarie alla sicurezza dell'operatore. L'utilizzo di contenitori chiusi ad alta pressione presenta alcuni vantaggi rispetto ai sistemi aperti, quali quelli di poter operare con minori volumi di acidi, di poter operare a temperature e pressioni più elevate di quella atmosferica, di diminuire il livello di contaminazione e di evitare la perdita di elementi volatili. Particolare attenzione deve essere rivolta al materiale con cui è fatto il contenitore, ad esempio con l'acido fluoridrico i contenitori non devono essere in vetro o quarzo. Si consiglia inoltre di utilizzare il minore volume possibile di soluzione acida, per minimizzare la contaminazione dei campioni da parte delle impurezze contenute negli acidi, e di preparare sempre dei bianchi di controllo.

3. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".

4. Apparecchiature

4.1 Vetreria di laboratorio

4.2 Piastra riscaldante o stufa dotata di controllo della temperatura e di temporizzatore

4.3 Contenitori chiusi per la digestione, singoli o in sistemi multiposto.

5. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere di grado ultrapuro e l'acqua utilizzata per la preparazione dei reattivi deve essere ad elevato grado di purezza (conducibilità <0,1µS/cm).

5.1 Acido nitrico concentrato di grado ultrapuro (HNO_3)

5.2 Acido cloridrico concentrato di grado ultrapuro (HCl)

6. Procedimento

6.1 Procedimento con il sistema chiuso

Per la mineralizzazione acida in un sistema chiuso sono utilizzati dei contenitori in PTFE o fluoro-polimeri con coperchio, alloggiati in piastre metalliche multiple o camicie metalliche singole, dotate di valvole per la pressione. Prelevare, preferibilmente per pesata, e trasferire nel contenitore per la digestione 45 mL di campione acquoso, dopo averlo ben mescolato. Aggiungere 5 mL di HNO_3. Chiudere il contenitore con il coperchio e controllare la valvola per il controllo della pressione, seguendo le istruzioni della casa produttrice. Preparare per ogni tornata di campioni anche dei bianchi (45 mL di acqua e 5 mL di acido), i campioni con le aggiunte e i campioni in doppio, secondo il protocollo del controllo di qualità. Porre il sistema in stufa a 95°C per due ore. Lasciar raffreddare a temperatura ambiente ed aprire i contenitori sotto cappa. Trasferire i campioni digeriti in bottiglie di plastica, opportunamente lavate con acido; qualora si noti la presenza di precipitato lasciar sedimentare o filtrare il campione digerito.

6.2 Procedimento con il sistema aperto

6.2.1 Mineralizzazione con acido nitrico

Agitare il campione e trasferire un volume adeguato (100 mL) in una beuta da 125 mL, aggiungere 5 mL di acido nitrico, riscaldare su una piastra e lasciar evaporare fino al minor volume possibile (10-20 mL). Continuare a riscaldare e ad aggiungere acido nitrico, se necessario, fino a che la mineralizzazione sia completa, cioè fino ad ottenere una soluzione trasparente ed incolore. Non fare andare a secco. Trasferire la soluzione, dopo averla filtrata se necessario, in un matraccio tarato da 100 mL, aggiungere due successive aliquote di 5 mL di acqua con cui sono state lavate le pareti della beuta, lasciar raffreddare la soluzione e portare a volume con acqua. Per campioni a basse concentrazioni si consiglia di aumentare il volume iniziale di campione.

6.2.2 Mineralizzazione con acido nitrico e cloridrico

Se fosse necessaria una mineralizzazione più forte, agitare il campione e trasferire un volume adeguato (100 mL) in una beuta da 125 mL, aggiungendo 3 mL di acido nitrico, riscaldare su una piastra e far evaporare il campione fino a un volume di 5 mL, evitando l'ebollizione o di mandare a secco il campione. Far raffreddare ed aggiungere 5 mL di acido nitri-

co, coprire con un vetro di orologio, porre nuovamente sulla piastra riscaldante, aumentando la temperatura fino ad ottenere un leggero riflusso. Continuare il riscaldamento, aggiungendo ulteriore acido se necessario, fino a digestione completa, evaporare fino a un volume di 5 mL e raffreddare nuovamente. Aggiungere 10 mL (1+1) di HCl e 15 mL di acqua. Riscaldare per altri 15 minuti per sciogliere il precipitato o il residuo. Far raffreddare la soluzione e trasferirla in matraccio tarato da 100 mL; lavare le pareti della beuta e il vetro di orologio con acqua versandola, dopo eventuale filtrazione, nello stesso matraccio tarato. In alternativa centrifugare o lasciar sedimentare. Infine portare a volume. Per campioni a basse concentrazioni si consiglia di aumentare il volume iniziale di campione.

7. Calcoli

Riportare i risultati come segue:

$$\text{Concentrazione del metallo (mg/L)} = A \times B/C$$

dove:
A = concentrazione (mg/L) del metallo nella soluzione digerita;
B = volume finale (mL) della soluzione digerita;
C = volume (mL) di campione.

METODO B - Mineralizzazione acida con sistema a microonde

Introduzione

Negli ultimi decenni l'impiego delle microonde come sorgente di energia termica ha trovato una vastissima applicazione, sia in campo industriale che domestico. L'energia delle microonde copre uno spettro di frequenze varianti tra 300 e 300.000 MHz, mentre le frequenze normalmente usate in campo industriale e scientifico variano tra i 900 e i 5000 MHz. La frequenza più usata per i forni a microonde, che corrisponde anche alla frequenza utilizzata nei forni a microonde domestici, è di 2450 MHz. L'energia a microonde è una radiazione non ionizzante che accentua il movimento molecolare per migrazione degli ioni o rotazione dei dipoli, senza necessariamente causare mutamenti nella struttura molecolare.
Generalmente l'energia a microonde è assorbita dal campione mediante due meccanismi: la conduzione ionica e la rotazione dei dipoli. La conduzione ionica è la migrazione conduttiva degli ioni disciolti presenti nelle soluzioni sotto l'effetto di un campo elettromagnetico. Tale migrazione è influenzata da parametri quali la concentrazione, la mobilità degli ioni e la temperatura della soluzione. La rotazione dei dipoli consiste invece nell'allineamento delle molecole che hanno momenti di dipolo non nulli, sotto l'effetto di un campo magnetico. Ambedue questi meccanismi avvengono nella maggior parte dei casi simultaneamente. Inoltre, rispetto al riscaldamento tradizionale per conduzione, le microonde riscaldano contemporaneamente tutto il campione, senza riscaldare i contenitori utilizzati che sono di materiali trasparenti alle microonde. In tal modo le soluzioni raggiungono molto più rapidamente il proprio punto di ebollizione e il riscaldamento è molto più veloce ed efficace del sistema tradizionale.
Nei laboratori analitici, la possibilità di sviluppare calore controllabile in modo selettivo ha reso possibile l'applicazione delle microonde oltre che a trattamenti generali di riscaldamento, anche a processi di disidratazione rapida e alla determinazione analitica dell'umidità di campioni diversi, a reazioni chimiche delicate da condurre in breve tempo a temperatura controllata in modo riproducibile e a tecniche rapide per la preparazione dei campioni d'analisi.
I campi di applicazione attuali sono notevolmente ampi, e comprendono la preparazione dei campioni per l'analisi mediante spettrometria atomica o al plasma, polarografia ed altri metodi elettrochimici, mediante processi di solubilizzazione dei materiali inorganici e di incenerimento e/o mineralizzazione umida delle sostanze organiche.

1. Principio del metodo

Il metodo consiste in una digestione con acido concentrato a caldo, in recipienti chiusi in forni a microonde diffuse o in recipienti aperti in forni a microonde focalizzate, di campioni acquosi tal quali per portare in soluzione i metalli associati al particolato o presenti in forma colloidale e/o organica. La digestione di campioni acquosi tal quali, che può avvenire con modalità più o meno drastiche, dà una stima del metallo totale, che è funzione oltre che delle condizioni sperimentali anche delle proprietà specifiche del metallo.
I metalli totali così ottenuti possono essere analizzati con spettrometria di emissione in sorgente plasma (ICP-OES) o spettrometria di assorbimento atomico (in fiamma, F-AAS, mediante atomizzazione elettrotermica, ETA-AAS, mediante formazione di idruri, HG-AAS).
Esistono, allo stato attuale, due famiglie di strumenti: quelli che prevedono il riscaldamento con microonde diffuse e quelli con microonde focalizzate. I componenti principali delle due tipologie di strumenti sono identici: Le microonde sono generate da un generatore (chiamato magnetron), propagate attraverso una guida d'onda e propagate all'interno della camera di riscaldamento.
Nei *sistemi a microonde diffuse*, le microonde emesse dal magnetron sono erogate, per mezzo di un agitatore, all'interno del forno, che deve essere ermeticamente chiuso per evitare la dispersione delle microonde all'esterno, dove vanno rimbalzando tra le sue pareti costruite di metallo che le riflette in tutte le direzioni. I campioni sono contenuti in contenitori ermeticamente chiusi costituiti di materiali trasparenti alle microonde (PTFE, quarzo, ecc.) e in grado di sopportare gli aumenti di temperatura e pressione che si generano all'interno dei contenitori stessi. Negli strumenti di nuova concezione, sono inoltre previsti dei sistemi di regolazione e controllo delle pressioni e delle temperature all'interno dei contenitori.
Gli *strumenti a microonde focalizzate*, invece, focalizzano le microonde prodotte dal magnetron in un fascio ristretto verso la cavità dove è situato il campione. Il fascio di microonde è in tal modo focalizzato direttamente sulla parte inferiore del contenitore dove si trova la miscela del campione con i reagenti, consentendo di ridurre la potenza applicata e quindi la dispersione dell'energia elettromagnetica. Si può perciò lavorare a pressione atmosferica con contenitori aperti muniti di refrigerante a ricadere per assicurare la necessaria azione di riflusso.
In entrambe le configurazioni strumentali la camera è fornita di un camino o di un sistema di estrazione dei vapori prodotti, che è collegato a sistemi di ventilazione programmabile o a dispositivi di aspirazione e di abbattimento dei fumi.

2. Interferenze e cause di errore

L'utilizzo del forno a microonde permette di minimizzare i tempi di analisi e le quantità di acido da utilizzare.
Alte concentrazioni di materiale organico presente nei campioni, possono causare pressioni troppo elevate nei contenitori utilizzati, con il rischio di avere perdite di materiale durante la mineralizzazione. In tali casi converrà ridurre la quantità di campione sottoposto a mineralizzazione e, in ogni caso, è preferibile l'utilizzo di strumentazioni che prevedano il controllo della pressione e/o della temperatura.

3. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".

4. Apparecchiature

4.1 Apparecchiatura a microonde diffuse

4.1.1 Forno a microonde diffuse che consenta la programmazione della potenza erogata

(generalmente i forni attualmente in commercio hanno potenze massime nominali comprese tra 600 e 1200 Watt). È consigliabile sia presente un sistema di monitoraggio della temperatura e/o della pressione all'interno dei contenitori durante la mineralizzazione.

4.1.2 Contenitori chiusi per la digestione, in materiale polimerico (PTFE o fluoro-polimeri) resistente agli acidi e in grado di resistere ad elevate pressioni (almeno 30 bar).

4.2 Apparecchiatura a microonde focalizzate

4.2.1 Forno a microonde focalizzate che consenta la programmazione della potenza erogata (generalmente i forni attualmente in commercio hanno potenze massime nominali comprese tra 200 e 600 Watt). Deve essere presente un sistema di monitoraggio della temperatura e un sistema a ricadere per la condensazione dei fumi prodotti durante la mineralizzazione.

4.2.2 Contenitori aperti per la digestione, in materiale polimerico (PTFE o fluoro-polimeri), in vetro pyrex o in quarzo o in alternativa sistema di iniezione in flusso del campione per la mineralizzazione "on-line" del campione durante la fase di lettura.

4.3 Bilancia analitica, risoluzione 0,01 g.

5. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere di grado ultrapuro e l'acqua utilizzata per la preparazione dei reattivi deve essere ad elevato grado di purezza (conducibilità <0,1 µS/cm).

5.1 Acido nitrico concentrato di grado ultrapuro (HNO_3) (d=1,40)

6. Procedimento

Indicazioni di carattere generale sull'acido o la miscela di acidi da utilizzare nel procedimento di digestione, in relazione alle diverse tipologie di matrici, sono riportate al Capitolo 2 del metodo A.
Preparare per ogni tornata di campioni anche dei bianchi, i campioni con le aggiunte e i campioni in doppio, secondo il protocollo del controllo di qualità. Eseguire la mineralizzazione in forno a microonde adottando un programma termico costruito seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento.
Alla fine della digestione, dopo aver lasciato raffreddare i campioni a temperatura ambiente, aprire i contenitori sotto cappa e trasferire i campioni in matracci tarati. Lavare le pareti dei contenitori con acqua e versare le acque di lavaggio nei rispettivi matracci, portando infine a volume. Nel caso si verifichino perdite significative del campione, eliminarlo e ripetere la mineralizzazione. Trasferire quindi i campioni digeriti in bottiglie di polietilene, opportunamente lavate con acido; qualora si noti presenza di precipitato lasciar sedimentare o filtrare il campione digerito, sempre senza operare alcuna diluizione del campione.
Esistono in commercio anche strumentazioni che prevedono l'addizione "on-line" dell'acido nitrico al campione. Il campione viene quindi fatto passare in un forno a microonde focalizzate e sottoposto "in flusso" all'azione delle microonde. All'uscita del forno il campione va direttamente allo strumento per l'analisi.

7. Calcoli

Riportare i risultati come segue:

$$\text{Concentrazione del metallo (mg/L)} = A \times B/C$$

dove:
A = concentrazione (mg/L) del metallo nella soluzione digerita;
B = volume finale (mL) della soluzione digerita;
C = volume (mL) di campione.

Nel caso invece del sistema in flusso, si ha direttamente il risultato finale, in quanto campioni da analizzare e soluzioni di riferimento subiscono il medesimo trattamento e quindi la medesima diluizione.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX edition, (Washington, APHA).

KINGSTON H.M. & JASSIE L.B. (1988): *"Introduction to Microwawe Sample Preparation: Theory and Practice*. American Chem. Soc., Washington, DC.

KINGSTON H.M. & WALTER P.J. (1992): "Comparison of microwawe versus conventional dissolution for environmental applications", *Spectroscopy*, **7**, 20-27.

KINGSTON H.M., WALTER P.J., CHALK S.J., LORENTZEN E.M. & LINK D.D. (1997): "Microwawe-Enhanced Chemistry: Fundamentals, Sample Preparation, and Applications", Kingston, H.M, Haswell, S.J. (Eds), *Microwawe-Enhanced Chemistry*: *Fundamentals, Sample Preparation, and Applications*", American Chem. Soc., Washington, Cap 3, 223-349.

U.S. EPA (1990):" *Microwawe assisted acid digestion of aqueous samples and extracts*". SW-846 Method 3015, Test Method for Evaluating Solid Waste, Washington.

ZLOTORZYNSKI A. (1995): "The application of microwawe radiation to analytical and environmental chemistry", *Critical Rev. in Anal. Chem.*, **25**, 43-76.

APPENDICE

A1 - Raccomandazioni sull'uso in sicurezza del microonde

Riguardo l'uso del microonde si raccomanda quanto segue:

1. Esistono molte raccomandazioni d'uso e sicurezze specifiche per ogni modello di forno a microonde, relativamente alla schermatura dello strumento in oggetto, al possibile rilascio nell'ambiente di microonde e alla sicurezza dell'operatore dalla contaminazione degli acidi usati per la mineralizzazione. Non è possibile in questa sede operare una lista di tutte le possibili avvertenze dei vari modelli, si rimanda perciò alla consultazione del manuale d'uso dello strumento del laboratorio.
2. I contenitori per l'attacco a microonde sono comunemente costituiti da un "liner" interno e da uno o più contenitori esterni. I contenitori esterni non sono spesso così resistenti agli acidi e alla pressione come i "liner" interni: degradazioni chimiche o fisiche di questi contenitori possono perciò causare problemi di efficienza del sistema e di sicurezza dell'operatore. Si consiglia perciò di operare un controllo periodico dello stato di conservazione di questi contenitori.
3. Durante la mineralizzazione a microonde la pressione interna dei contenitori raggiunge valori elevati: si sconsiglia pertanto l'uso di contenitori senza valvole di sfogo in grado di rompersi alle pressioni indicate dal costruttore. Deve essere inoltre assicurata un'efficiente aspirazione dall'interno del forno a microonde a una cappa chimica per evitare che la rottura della valvola di un contenitore possa immettere nell'ambiente vapori acidi con pericolo per l'operatore.
4. Si deve in ogni caso evitare l'uso di forni a microonde domestici, del tipo di quelli da cucina.

A2 - Norme per la taratura di un forno a microonde

1. Pesare una quantità esatta di acqua deionizzata in un bicchiere di teflon da 1 litro. Lasciare riposare a temperatura ambiente il contenitore con l'acqua, quindi misurare la temperatura dell'acqua con una termocoppia tarata.
2. Porre quindi il contenitore nel forno a microonde e sottoporlo a riscaldamento per un tempo definito (generalmente 1-2 minuti) alla potenza voluta, impostando l'apposito programma di riscaldamento.
3. Terminato il programma, togliere il contenitore dal forno, aggiungere un'ancoretta magnetica e agitare il liquido su un agitatore magnetico, quindi misurare la temperatura. La misura della temperatura deve essere effettuata in ogni caso entro 30 secondi dalla fine del programma termico.
4. Calcolare la differenza di temperatura tra il valore misurato dopo il riscaldamento e il valore iniziale.
5. Ripetere le operazioni descritte ai punti 1÷4 altre 2 volte.
6. Calcolare la media delle tre differenze di temperatura.

L'innalzamento di temperatura è correlato alla potenza effettivamente erogata mediante la formula seguente:

$$p = \frac{K \cdot Cp \cdot m \cdot \Delta T_m}{t}$$

dove
P = potenza apparente assorbita espressa in Watt;
K = fattore di conversione da calorie/sec a watt pari a 4,184;
Cp = calore specifico dell'acqua a temperatura ambiente pari a 0,9997 $cal \cdot g^{-1} \cdot C^{-1}$);
m = massa dell'acqua espressa in grammi;
ΔT_m = media delle differenze di temperatura registrate prima e dopo il riscaldamento nel forno;
t = tempo di riscaldamento in secondi.

3020. Determinazione di elementi chimici mediante spettroscopia di emissione con sorgente al plasma (ICP-OES)

1. Principio del metodo

La base del metodo consiste nella misura delle intensità delle radiazioni elettromagnetiche emesse dagli atomi/ioni eccitati delle specie presenti nel campione, mediante tecniche spettrometriche con sorgente al plasma (ICP-OES). Il plasma è un gas altamente ionizzato, prodotto, in strumenti ICP, per induzione elettromagnetica generata da un campo di radiofrequenze. Le più comuni radiofrequenze usate sono dell'ordine di 27 o 40 Mhz. Il campione e le soluzioni di taratura vengono opportunamente nebulizzate e l'aerosol viene trasportato nel plasma, dove, in seguito a fenomeni di eccitazione, avviene la produzione dello spettro di emissione composto dalle righe caratteristiche degli elementi presenti. Tali righe, dopo essere state separate mediante un sistema di dispersione vengono inviate su un rivelatore (fotomoltiplicatore o a stato solido) che produce un segnale elettrico di intensità proporzionale all'intensità delle righe di emissione. Le intensità di emissione vengono rilevate, simultaneamente o in sequenza, e la concentrazione di analita presente nel campione viene determinata per confronto con una soluzione di riferimento a concentrazione nota.

2. Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione delle frazioni disciolta, particolata e totale di 34 elementi chimici in acque reflue, superficiali, di falda e potabili. La Tab. 1 riporta l'elenco degli elementi per i quali il metodo è applicabile, le principali lunghezze d'onda analitiche ed i limiti di rivelabilità "tipici" ottenibili per ciascun elemento. Le indicazioni di Tab. 1 sono riportate a scopo puramente orientativo, in quanto dipendono strettamente dalle caratteristiche tecniche dell'apparecchiatura utilizzata. Si possono utilizzare altre lunghezze d'onda, se queste garantiscono una sensibilità sufficiente al soddisfacimento delle richieste analitiche e soprattutto la possibilità di minimizzare le eventuali interferenze spettrali presenti.

3. Interferenze e cause di errore

La spettroscopia di emissione con sorgente al plasma (ICP-OES) rappresenta una tecnica analitica "relativa" con la quale è possibile determinare la concentrazione degli analiti solo se essi vengono confrontati con soluzioni di riferimento a concentrazione nota. Qualsiasi caratteristica del campione che provoca una variazione dell'ampiezza del segnale di emissione rispetto ai campioni di riferimento, genera un disturbo. L'insieme di tutti i potenziali disturbi che conducono ad errori di misura viene definito "interferenza". In considerazione poi dell'origine del disturbo, si definiscono interferenze chimiche, fisiche, spettrali (del fondo o di riga). L'insieme delle interferenze menzionate (che possono essere potenzialmente presenti), se non adeguatamente corrette, producono variazioni dell'intercetta sull'asse Y della retta di taratura (effetto di tipo additivo) oppure variazione del coefficiente angolare della retta (effetto di tipo moltiplicativo). L'effetto di tipo additivo è riconducibile ad interferenze dovute al fondo o di riga mentre l'effetto di tipo moltiplicativo è riconducibile ad interferenze di natura chimica e/o fisica che alterano i processi di trasporto alla torcia o di eccitazione, producendo modificazioni nel processo di nebulizzazione o di eccitazione.

3.1 Interferenze del fondo (o "background")

Le interferenze del fondo possono essere sia negative che positive e sono causate da uno o più componenti della matrice che, direttamente o indirettamente, provocano uno dei seguenti fenomeni: variazione di temperatura della sorgente (con conseguente variazione del "continuo" emesso dalla sorgente), bande di emissione molecolari, "luce diffusa", ricombinazioni ioni-elettroni.
L'entità di queste interferenze varia con le condizioni operative adottate e solo nel caso della "luce diffusa", alcune soluzioni strumentali (reticolo olografico, doppio monocromatore, ecc.) possono ridurre sensibilmente il problema. La misura del segnale di emissione e del fondo, necessaria per la correzione dell'interferenza, viene comunemente eseguita ai lati della riga analitica. La zona spettrale in cui viene effettuata la misura dipende dalla complessità dello spettro intorno alla riga analitica prefissata. È possibile effettuare una correzione del fondo da uno o da entrambi i lati della riga analitica.
Conoscendo il tipo di sostanza interferente, la sua concentrazione e ammettendo che sia costante nei diversi campioni è possibile effettuare la correzione di questa interferenza anche ricorrendo al metodo della matrice simulata.

3.2 Interferenze di riga o spettrali

Le interferenze di riga si verificano per sovrapposizione (parziale o totale) tra la riga analitica e la riga di un altro elemento. La sovrapposizione può essere "virtuale" in quanto dovuta a scarsa risoluzione dello spettrometro, o reale, ossia la riga interferente cade entro la larghezza della riga analitica. La correzione delle interferenze dovute a sovrapposizione di riga non è sempre possibile e comporta comunque un peggioramento della precisione analitica. Per tali motivi è sempre conveniente impiegare un'altra riga analitica esente da interferenze, se disponibile, avente un adeguato potere separativo. La possibilità di correggere questo tipo di interferenze dipende dal grado di sovrapposizione e dal rapporto di intensità tra le due righe. In alcuni casi, infatti, la riga analitica è totalmente "nascosta" dalla riga interferente e pertanto non esiste alcuna possibilità di impiegare tale riga per effettuare la misura analitica (se non quella di separare chimicamente l'analita dall'interferente). Nel caso, invece, di sovrapposizioni meno marcate è possibile effettuare interventi di correzione. Attualmente, questi si basano sul calcolo del valore di intensità di emissione prodotto dall'elemento interferente in corrispondenza del picco analitico, valore che viene sottratto al segnale di emissione totale per ottenere il segnale "pulito" dovuto all'analita. Il calcolo di questo valore può essere effettuato con diverse procedure di interpolazione matematica. Esistono diversi atlanti e procedure "software" per l'individuazione e la correzione di interferenze spettrali, ma non di rado ci si trova di fronte ad interferenze "non previste". Rimane pertanto la necessità di effettuare uno studio sperimentale ogni qualvolta si analizza una nuova tipologia di matrice (o comunque con differenti rapporti interelementari), allo scopo di evidenziare la presenza di interferenze spettrali.
La Tab. 2 fornisce una lista delle interferenze spettrali più comuni per i vari elementi analizzati. Nel caso di strumenti simultanei in cui è possibile analizzare contemporaneamente lo stesso analita a più lunghezze d'onda è particolarmente agevole verificare la presenza di interferenze spettrali confrontando la risposta strumentale tra due o più righe analitiche e rigettando quella che fornisce risultati anomali.

Tabella 1: Righe analitiche raccomandate e relativi limiti di rivelabilità (mg/L) (APHA, 1998; EPA, 1992)

Elemento	Riga (nm)	Limite di rivelabilità (mg/L)
Ag	328,068	0,005
	338,289	0,01
Al	308,215	0,04
	396,152	0,03
	237,312	0,03
As	193,696	0,03
	197,197	0,1
	189,042 *	0,14
B	208,959	0,001
	249,678	0,006
	249,773	0,005
Ba	233,527	0,004
	455,403	0,002
	493,409	0,001
Be	313,042	0,0007
	234,861	0,0003
Bi	223,061	0,04
	306,772	0,08
Ca	317,933	0,01
	393,366	0,0002
	315,89	0,02
Cd	214,438	0,004
	226,502	0,002
	228,802	0,003
Co	228,616	0,007
	230,786	0,01
Cr	205,552	0,01
	206,15	0,007
	267,716	0,01
	283,563	0,01
	284,325	0,01
Cu	324,754	0,005
	327,396	0,01
	219,958	0,01
Fe	259,940	0,007
	238,204	0,005
	239,562	0,005
K	766,490 **	2
	769,896	-
Li	460,286	0,9
	670,784	0,004
Mg	279,079	0,03
	279,553	0,0005
	285,213	0,001
Mn	257,610	0,002
	293,306	0,01
	294,92	0,008
Mo	202,030	0,008
	203,844	0,02
Na	589,592	0,1
	588,995	0,03
Ni	221,647	0,01
	231,604	0,015
	232,003	0,02
P	213,618	0,1
	214,914	0,1
Pb	220,353	0,03
	216,999	0,1

segue

segue

Elemento	Riga (nm)	Limite di rivelabilità (mg/L)
S	182,037 *	0,5
Sb	206,833 217,581	0,03 0,05
Se	196,090 203,985	0,08 0,1
Si	251,611 212,412 288,158	0,02 0,02 0,03
Sn	235,484 189,980 *	0,1 0,02
Sr	407,771 421,552 460,733	0,0005 0,0006 0,1
Ti	334,941 337,280 336,121	0,005 0,01 0,01
Tl	190,864 * 276,787	0,03 0,1
V	290,882 292,402 310,230	0,01 0,01 0,01
W	207,911 209,860 239,709	0,03 0,05 0,06
Zn	206,200 202,548 213,856	0,005 0,004 0,002
Zr	343,823 339,198	0,01 0,008

** collocare il sistema ottico dello strumento sotto vuoto o sotto flusso di gas inerte; ** interferisce il Mg sulla misura del K.*

3.3 Interferenze di tipo chimico e/o fisico

Le interferenze di tipo moltiplicativo si manifestano come modificazioni del segnale analitico e sono prodotte dalla matrice che produce alterazioni nei processi di trasporto alla torcia, desolvatazione, atomizzazione, eccitazione. Le interferenze connesse al processo di trasporto e desolvatazione sono principalmente riferibili a variazioni di densità, viscosità e tensione superficiale della soluzione. Variazioni dell'efficienza del meccanismo di trasporto possono anche essere dovute a una distribuzione non omogenea di matrice e analita nelle particelle di aerosol nebulizzate. I processi di atomizzazione ed eccitazione dell'analita raramente risultano interferiti dalla matrice. Per taluni elementi possono a volte verificarsi interferenze dovute a modifiche dell'equilibrio di ionizzazione dell'analita. L'effetto positivo o negativo sulla sensibilità analitica è da porre in relazione all'origine ionica o atomica della riga analitica. Le interferenze che producono un effetto di tipo moltiplicativo sulla sensibilità analitica possono essere corrette soddisfacentemente adottando opportune procedure di taratura quali il metodo delle aggiunte note, il metodo della soluzione di riferimento simulata e il metodo del riferimento interno. Nel caso di strumentazione sequenziale è possibile rendersi conto di eventuali interferenze analizzando il campione tal quale e dopo opportuna diluizione: se per il campione corretto dalla diluizione si ottengono valori insoddisfacenti, o comunque oltre i valori di accuratezza accettabili, si può essere in presenza di interferenze di natura chimica e/o fisica non meglio identificate, di cui è necessario individuare le cause. Un altro possibile metodo per accertare la presenza di interferenze fa riferimento alle aggiunte note: se anche l'aggiunta di analita, nell'ordine di concentrazioni comprese fra 10 e 100 volte il limite di rivelabilità, porta a risultati al di fuori dei limiti dell'accuratezza del metodo, si è probabilmente in presenza di sensibili effetti matrice.

Tabella 2: Righe analitiche raccomandate e interferenze spettrali

Elemento	Riga (nm)	Interferenze spettrali
Ag	328,060 338,289	Fe, Mn, V Cr
Al	308,215 396,152 167,080	Mn, V, Fe, Mo, Co Mo, Cu Fe
As	193,696 197,197 189,042	Fe, Al, V Fe, Al Al
B	208,959 249,678 249,773	Al, Mo Fe, Cr Fe
Ba	233,527 455,403 493,409	Fe, V
Be	313,042 234,861	V Fe
Bi	223,061 306,772	Cu Fe, V
Ca	317,933 393,366	Fe, V
Cd	214,438 226,502 228,802	Fe Fe As, Co
Co	228,616	Ti
Cr	205,552 267,716 283,563 284,325	Fe, Mo Mn, V Fe, Mo Fe
Cu	324,754 327,396	Ti
Fe	259,940	
K	766,490	Mg
Li	460,286 670,784	Fe
Mg	279,079 279,553 285,213	 Fe
Mn	257,610 293,306	Fe, Mo, Cr Al, Fe
Pb	220,353	Al, Co, Ti
S	182,037	Cr, Mo
Sb	206,833 217,581	Ni, Mo, Cr, Mg, Co, Mn
Se	196,026 203,985	Mo
Si	251,611 212,412 288,158	
Sn	235,484 189,980	Mo, Co Mo
Sr	407,771 421,552 460,733	
Ti	334,941 336,121 337,280	Ca, Cr, Si
Tl	190,846 276,787	

segue

segue

Elemento	Riga (nm)	Interferenze spettrali
V	290,882 292,402 310,230	Fe, Mo Fe, Mo, Cr
W	207,911 209,860 239,709	
Zn	206,200 213,856	Cr Cu, Ni, Fe
Zr	343,823 354,262	

4. Campionamento e conservazione del campione

Prima di prelevare i campioni analitici è necessario conoscere in dettaglio il tipo di determinazioni richieste (es. metalli totali o disciolti) in modo tale da adottare le precauzioni più opportune ai fini della conservazione del campione e/o di eventuali trattamenti preliminari che dovessero rendersi necessari (es. filtrazione, condizionamento con acidi e mineralizzazione).
Il campionamento deve essere effettuato in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento", che prevede, per la determinazione delle specie disciolte, la filtrazione attraverso filtri da 0,45 µm e l'acidificazione della soluzione con 1 mL di HNO_3 concentrato per litro di campione (in modo da avere un pH<2). La concentrazione di metallo totale può essere determinata come somma del metallo in soluzione più il metallo presente nella fase particolata, facendo riferimento alle Sezioni 3000 e 3010.
È buona norma considerare sempre l'opportunità di predisporre un "bianco di campo", ottenuto semplicemente mediante lo stoccaggio di un'aliquota di acqua ultrapura in un recipiente identico a quello dei prelievi, da sottoporre successivamente a tutte le fasi analitiche previste per i campioni. Altri sistemi di controllo della qualità del campionamento consistono nell'uso di campioni replicati, nella attivazione di precauzioni per proteggere singolarmente i campioni in modo da evitare qualsiasi possibile contaminazione, nell'avvinamento regolare dei recipienti.
Per la conservazione dei campioni si consiglia l'uso di recipienti in policarbonato, polietilene, teflon o altro materiale caratterizzato da una scarsa capacità di cessione ed adsorbimento di metalli, precedentemente trattati con HNO_3 1 M per una notte e successivamente lavati con acqua ad elevato grado di purezza.
Nei campioni da sottoporre ad analisi le concentrazioni dei vari analiti presenti possono variare sensibilmente nel tempo, a causa di fenomeni di coprecipitazione e adsorbimento sulle pareti dei contenitori; si consiglia pertanto di condurre le determinazioni nel più breve tempo possibile dal campionamento.

5. Apparecchiature

5.1 *Spettrometro ICP-OES*, eventualmente corredato di autocampionatore.

Per dettagli sulle caratteristiche di queste apparecchiature si rimanda al Sottoparagrafo 3.2.6 della Sezione 1020 "Lineamenti di tecniche analitiche".

6. Reattivi

Tutti i reattivi e l'acqua utilizzata per i lavaggi e la preparazione delle soluzioni di riferimento devono essere ad elevato grado di purezza.

6.1 Acido nitrico concentrato (d=1,40)

6.2 Soluzioni di riferimento

Utilizzare soluzioni di riferimento a titolo noto (es. 1000 mg/L). Esistono in commercio soluzioni di riferimento multielementari che possono essere convenientemente utilizzate per l'analisi di più analiti. Preparare per diluizione dalle soluzioni madre le soluzioni di riferimento alla concentrazione desiderata, avendo cura di aggiungere 0,5 mL di HNO_3 concentrato prima di portare a volume con acqua demineralizzata in matracci tarati da 100 mL. Queste soluzioni sono stabili per parecchie settimane. In funzione delle esigenze analitiche è possibile utilizzare soluzioni di taratura monoelementari o multielementari. In quest'ultimo caso verificare che la miscelazione degli elementi considerati non dia luogo a interferenze di tipo spettrale o chimico (es. coprecipitazione). Alcuni esempi di possibili soluzioni di riferimento multielementari che tengono conto delle compatibilità interelementari sono riportate in Tab. 3. Come bianco per la taratura analitica si utilizza una soluzione di acqua demineralizzata allo 0,5% di HNO_3. Per la conservazione delle soluzioni di riferimento attenersi alle indicazioni riguardanti le modalità di conservazione del campione riportate al Capitolo 4 precedente.

6.3 Soluzioni per la verifica e l'ottimizzazione delle condizioni strumentali

6.3.1 Soluzione di riferimento di Na (1000 mg/L) per la verifica del flusso di aspirazione al nebulizzatore.

6.3.2 Soluzione di Mn (10 mg/L allo 0,5% HNO_3) o in alternativa

6.3.3 Soluzione di As, Ba, Mn, Sr e Zn (10 mg/L di ciascun elemento allo 0,5% HNO_3) per la verifica della concentrazione equivalente al fondo (BEC), del limite di rivelabilità (LR) e della precisione delle determinazioni (CV%).

6.3.4 Soluzione di riferimento di Al (1000 mg/L) per la verifica della linearità della curva di taratura. In funzione di esigenze analitiche specifiche, è sempre possibile utilizzare una soluzione multielementare contenente gli analiti di interesse ad una concentrazione almeno 100 volte maggiore del limite di rivelabilità tipico per quell'elemento.

Tabella 3: Preparazione delle soluzioni di taratura multielementari

Soluzione mista 1	Ba, Cu, Co, Fe, V
Soluzione mista 2	Be, Cd, Mn, Pb, Se, Zn
Soluzione mista 3	As, Li, Mo, Si, Sr
Soluzione mista 4	Al, Ca, Cr, K, Na, Ni
Soluzione mista 5	Ag, B, Mg, Sb, Tl

7. Procedimento

7.1 Ottimizzazione dei parametri strumentali

Per migliorare le prestazioni analitiche dell'apparecchiatura e per minimizzare eventuali interferenze, è indispensabile procedere alla ottimizzazione dei parametri strumentali. Nelle normali condizioni operative si tende infatti a raggiungere un compromesso tra i vari parametri allo scopo di assicurare un adeguato potere di rivelabilità per tutti gli analiti che devono essere determinati nel campione in esame. I parametri dello strumento sui quali è possibile intervenire sono quelli relativi alla sorgente, all'unità per l'introduzione del campione, all'interfaccia torcia/spettrometro e allo spettrometro. I citati parametri vengono ottimizzati uno alla volta allo scopo di ottenere il miglior rapporto segnale analitico/segnale di fondo.

7.1.1 Sorgente

I parametri operativi caratteristici della sorgente plasma sono i seguenti:

a) potenza applicata;
b) flusso del gas plasmageno;
c) flusso del gas ausiliario.

Una maggior temperatura del plasma comporta un aumento del segnale del fondo e una variazione di sensibilità che dipende dalle caratteristiche della transizione in esame. Pertanto anche mediante tale parametro è possibile ottimizzare il rapporto segnale/fondo ed esercitare un controllo su alcuni tipi di interferenza. La temperatura del plasma viene controllata regolando opportunamente la potenza applicata e il flusso di gas plasmageno. L'aumento di temperatura della sorgente plasma favorisce i processi di atomizzazione, di eccitazione e di ionizzazione delle specie atomiche, anche in relazione alle caratteristiche della transizione atomica o ionica e, quindi, porta ad un aumento della sensibilità analitica tranne per il sodio e potassio. Quando ad esempio si misura l'intensità di una riga di emissione atomica un aumento troppo elevato della potenza applicata può causare, in particolare per elementi a basso potenziale di ionizzazione, lo spopolamento del livello di partenza della transizione con conseguente diminuzione di sensibilità. Poichè il segnale di fondo aumenta comunque all'aumentare della temperatura del plasma, un aumento della potenza applicata può portare ad un peggioramento effettivo del rapporto segnale/fondo. L'aumento del flusso di gas plasmageno determina una maggiore "diluizione" dell'analita nel campione immesso nella sorgente con conseguente riduzione della sensibilità analitica.
Il gas ausiliario viene utilizzato per sollevare il plasma dall'orlo superiore della torcia e impedire così la formazione e deposizione di sali, specie quando si analizzano matrici organiche.

7.1.2 Unità di introduzione del campione

I parametri relativi all'unità di introduzione del campione variano a seconda del meccanismo di trasporto utilizzato. Nel caso in cui venga impiegato un nebulizzatore pneumatico, la pressione e il flusso del gas di trasporto comportano una variazione della velocità e della portata del gas. Aumentando il flusso del gas di trasporto, aumenta la concentrazione dell'analita nella torcia con relative maggiori sensibilità analitiche. Aumentando la velocità del gas di trasporto, peraltro, si facilita la deposizione dell'analita nel nucleo ad alta temperatura del plasma ma si riduce il tempo di permanenza con conseguente riduzione della sensibilità, in particolare per quegli elementi con alto potenziale di eccitazione. Questi due parametri (pressione e flusso) determinano anche la quantità di solvente introdotto nella torcia e quindi anche la temperatura e la concentrazione delle specie che danno luogo al segnale di fondo (ad es. le specie ossidrile). Il miglior compromesso tra sensibilità e precisione si ottiene generalmente con portate di aspirazione dell'ordine di 1 mL/min per soluzioni acquose e di 0,4-0,6 mL/min per solventi organici. Il sistema di drenaggio deve essere mantenuto efficiente, in modo da ridurre al minimo le oscillazioni di pressione della camera di nebulizzazione.

7.1.3 Torcia ed interfaccia ottica

I parametri di regolazione della torcia e dell'interfaccia ottica si identificano con l'altezza d'osservazione in torcia e con l'atmosfera circostante la stessa. Poichè la temperatura del plasma diminuisce all'aumentare della distanza dal nucleo della torcia, variando l'altezza di osservazione rispetto al bordo della torcia stessa è possibile esaminare zone del plasma a temperature diverse aventi diverse distribuzioni della densità di popolazione atomica e quindi di sensibilità. Il controllo dell'atmosfera circostante la sorgente plasma, nonchè di tutto il banco ottico, si rende necessario in caso di determinazioni analitiche a lunghezza d'onda inferiore a 190 nm. Questa esigenza può determinarsi sia per l'assenza di righe analitiche sfruttabili a lunghezza d'onda superiore, sia per la presenza di interferenze spettrali pesanti a lun-

ghezza d'onda superiori. Come è noto, la trasmissione delle radiazioni elettromagnetiche a lunghezze d'onda inferiori a 190 nm è ostacolata dall'assorbimento delle bande dell'ossigeno atmosferico, che va, pertanto, rimosso dal sistema ottico e dalle aree circostanti la sorgente plasma mediante un flusso di gas inerte (azoto, argon) oppure operando sottovuoto.

7.1.4 Spettrometro

I parametri di regolazione dello spettrometro risultano i seguenti:

a) geometria delle fenditure;
b) angolo di incidenza della radiazione sul reticolo;
c) tensione applicata al fotomoltiplicatore, (solo per strumenti dotati di questo dispositivo).

L'altezza della fenditura determina l'altezza dell'immagine osservata e pertanto influisce sul rapporto segnale/fondo. A tal fine sono preferite altezze ridotte, compatibilmente con l'ottenimento di una adeguata sensibilità strumentale. La larghezza della fenditura determina sia l'ampiezza spettrale trasmessa (banda passante) sia la larghezza dell'immagine osservata. Pertanto, una diminuzione della larghezza della fenditura, sebbene provochi una generale riduzione della sensibilità dello strumento, comporta d'altro canto, un netto miglioramento del rapporto segnale/fondo.
La selezione della lunghezza d'onda analitica viene condotta mediante la rotazione del reticolo disperdente che modifica così l'angolo di incidenza della radiazione emessa. Compatibilmente con la presenza di eventuali interferenze, e tranne i casi in cui la concentrazione dell'elemento da analizzare sia così elevata da consigliare l'uso di lunghezze d'onda meno sensibili, è sempre consigliabile selezionare la lunghezza d'onda più sensibile e, se necessario, diluire il campione.
L'alimentazione del fotomoltiplicatore è regolata in funzione del tipo e dell'intensità della banda analitica. Variando la tensione applicata al fotomoltiplicatore, si influisce sia sulla precisione della misura che sul rapporto segnale/fondo. In linea di principio è consigliabile utilizzare tensioni elevate avendo però cura di evitare fenomeni di saturazione elettronica. La tensione applicata al fotomoltiplicatore non dovrebbe comunque superare l'80% della tensione massima ammissibile.

7.2 Messa a punto dell'apparecchiatura

Avviare lo strumento ed attendere un tempo di riscaldamento e di stabilizzazione della apparecchiatura secondo quanto stabilito dal manuale d'uso dello strumento prima di iniziare qualsiasi operazione di taratura. La Tab. 4 fornisce una base di riferimento generale per le condizioni strumentali. A causa di differenze costruttive delle apparecchiature disponibili e delle loro diverse caratteristiche e potenzialità, l'operatore dovrà attenersi alle condizioni specifiche consigliate dai manuali operativi forniti a corredo dell'apparecchiatura.

7.2.1 Flusso di aspirazione al nebulizzatore

Aspirare una soluzione di riferimento di sodio a 1000 mg/L, (6.3.1) attendere circa trenta secondi e quindi, seguendo le condizioni riportate nel manuale operativo, regolare il flusso dell'aerosol del nebulizzatore sino ad ottenere una ben definita regione di emissione gialla nella sorgente al plasma che si estende fra 2 e 3 mm al di sopra della spirale in rame della radiofrequenza. Registrare il flusso di aspirazione del nebulizzatore, lavare con il bianco di taratura per almeno 3-4 minuti e misurare il volume di soluzione aspirata nell'unità di tempo (mL/min).

7.2.2 Rapporto segnale/fondo

Aspirare la soluzione (6.3.3) e registrare le intensità massime di emissione a diverse altezze

Tabella 4: Condizioni operative orientative per gli spettrometri di emissione in sorgente plasma	
Potenza della radiofrequenza	1.100 W
Pressione argon	275 kPa
Potenza della radiofrequenza riflessa	<5 W
Flusso argon raffreddamento	15÷20 L/min
Altezza di osservazione sopra l'avvolgimento per radiofrequenza	15 mm
Flusso argon trasporto (al nebulizzatore)	0,6÷0,8 L/min
Flusso argon ausiliario	0,5÷1 L /min
Diametro iniettore	>1 mm
Flusso aspirazione	1–2 mL/min

lungo la sorgente plasma (da 14 a 18 mm sopra l'avvolgimento in rame). Le lunghezze d'onda alle quali effettuare le letture sono rispettivamente 193,696 nm per As, 213,856 nm per Zn, 257,610 nm per Mn, 421,552 nm per Sr e 455,403 nm per Ba. Ripetere l'operazione con il bianco di taratura. Determinare gli andamenti dei rapporti segnale/rumore e scegliere la posizione per cui il citato rapporto risulta massimo per ciascun elemento. Nel caso di determinazioni simultanee mediare la posizione ottimale di osservazione per i diversi elementi.

7.2.3 Flusso di nebulizzazione

Aspirare con flussi crescenti la soluzione (6.3.3) e registrare le intensità di emissione dei vari analiti, alle righe analitiche prescelte, ogni 25 mL/min, nell'intervallo indicativo tra 500 e 1000 mL/min. Condurre almeno tre determinazioni successive e quindi ripetere l'operazione con il bianco di taratura. Dopo sottrazione dei valori del bianco da quelli di emissione si ottengono le intensità di emissione nette alle diverse velocità di flusso. Si riporta in grafico e si seleziona il valore di flusso al nebulizzatore per cui si ottiene la massima intensità del segnale.

7.3 Controllo dell'efficienza della strumentazione ICP-OES

Prima di iniziare le procedure analitiche è consigliabile controllare l'efficienza operativa della strumentazione ICP-OES verificando alcune caratteristiche analitiche quali: il limite di rivelabilità (LR), la concentrazione equivalente al fondo (BEC), la precisione a breve termine (RSD) e l'andamento della curva di taratura (cioè l'intervallo di concentrazione dell'analita entro il quale l'andamento è di tipo lineare). La misura di tali parametri permette di stabilire se lo strumento funziona correttamente e di verificare l'accurata messa a punto del metodo analitico che si intende utilizzare. Per ottenere le migliori prestazioni occorre procedere alla misura delle caratteristiche analitiche dopo almeno 30 minuti dall'inizio della generazione del plasma, onde evitare eventuali transitori non trascurabili del rumore di fondo e della sensibilità analitica. I valori di consenso relativi ai parametri analitici (LR, BEC, RSD_{max}) possono essere prescritti dai metodi di riferimento oppure venire stabiliti sulla base dei risultati ottenuti mediante conduzioni di una serie di prove sperimentali "in loco" o effettuate nell'ambito di prove interlaboratorio tra diversi laboratori accreditati.

7.3.1 Determinazione del BEC, della stabilità a breve termine (CV%), del limite di rivelabilità (LR)

Si tenga presente che i limiti di rivelabilità calcolati nel modo seguente hanno un ampio margine di errore (50% e più) dovuto al limitato numero di misure effettuate. Tutte le verifiche sotto riportate possono essere condotte, in funzione delle necessità analitiche, con elementi diversi da quelli qui indicati.
Leggere in sequenza il bianco e la soluzione multielementare (6.3.3). Effettuare dieci repliche su entrambe le soluzioni e registrare i risultati relativi alla soluzione multielementare. I coefficienti di variazione (CV%) relativi ai vari analiti considerati rappresentano la stabilità delle determinazioni a breve termine espressa in termini percentuali.

È possibile, a questo punto, calcolare il valore della concentrazione equivalente al fondo (BEC) per ogni singolo elemento in base alla seguente espressione:

$$BEC = \left(\frac{X_b}{X_s - X_b}\right) \cdot C_s$$

dove:
X_b = intensità media di emissione del bianco;
X_s = intensità media di emissione della soluzione multielementare contenente As, Zn, Mn, Sr e Ba;
C_s = concentrazione (mg/L) della soluzione.

Rileggere la prova in bianco come campione incognito; calcolare il limite di rivelabilità dell'elemento considerato in accordo con la seguente espressione:

$$LR = 3 \cdot S_t \left(\frac{C_s}{X_n}\right)$$

dove :
S_t = scarto tipo delle intensità misurate per la soluzione del bianco;
X_n = intensità media netta della soluzione multielementare contenente As, Zn, Mn, Sr e Ba;
C_s = concentrazione (mg/L) della soluzione.

Si consideri che in spettrometria di emissione al plasma l'elemento di riferimento solitamente considerato è il Mn e per tale motivo i controlli di BEC, CV e LR possono essere effettuati utilizzando la soluzione (6.3.2). Nel caso in cui si vogliano determinare i valori di precisione a breve termine in funzione della concentrazione di analita, si possono ripetere le misure fatte in precedenza per la soluzione multielementare contenente As, Zn, Mn, Sr e Ba considerando due livelli di concentrazione (rispettivamente il più basso ed il più alto) tra quelli che verranno utilizzati per la taratura dello spettrometro.

7.3.2 Linearità della curva di taratura

Preparare delle soluzioni alla concentrazione di 1 mg/L, 10 mg/L, 20 mg/L, 50 mg/L e 100 mg/L di Al a partire dalla soluzione (6.3.4) per diluizione con acqua deionizzata contenente HNO_3 allo 0,5%. Costruire la curva di taratura aspirando ed analizzando le soluzioni di taratura e il bianco. Effettuare le letture alle seguenti righe analitiche dell'alluminio: 308,215 nm, 309,271 nm, 394,401 nm, 396,152 nm. Visualizzare le curve di taratura e valutare la bontà della linearità calcolando il coefficiente di correlazione, (R^2>0,999), o mediante la stima dei residui della regressione.

7.3.3 Frequenza dei controlli

I parametri strumentali individuati devono essere controllati e verificati nel tempo con una frequenza che sarà funzione sia dell'utilizzo dello strumento che dello specifico parametro considerato. A titolo di esempio, per livelli di utilizzo medi di circa 3-4 giorni per settimana, la concentrazione equivalente al fondo e la ripetibilità a breve termine vanno controllati giornalmente (ogni volta che si utilizza lo strumento) mentre la ripetibilità a lungo termine va verificata solo per determinazioni che si protraggono per diverse ore. Il limite di rivelabilità e la linearità della curva di taratura devono essere verificate solo in fase di messa a punto/validazione del metodo analitico o quando si analizza per la prima volta una data tipologia di matrice. I controlli più operativi quali la verifica dei flussi al nebulizzatore o l'altezza di osservazione in torcia dovranno essere effettuati in occasione di qualche modifica della configurazione strumentale o quando i valori sperimentali di BEC, precisione e LR non soddisfino i valori di riferimento. In assenza di definiti valori a cui fare riferimento per il controllo di BEC,

CV% e LR si dovrà seguire l'andamento di tali parametri nel tempo, riportando i valori assoluti misurati in funzione del tempo e intervenendo con azioni correttive qualora si verifichino brusche variazioni dei valori determinati.

7.4 Taratura del metodo

Dopo aver ottimizzato le condizioni operative dello strumento come descritto in precedenza, costruire le rispettive curve di taratura degli analiti utilizzando, per ogni analita, tre soluzioni di lavoro preparate a partire dalle soluzioni di riferimento descritte in (6.2). Introdurre le soluzioni di lavoro ad una portata costante per almeno 30 s ed attendere il raggiungimento delle condizioni di equilibrio prima di iniziare l'integrazione del segnale. Tra una determinazione e l'altra effettuare lavaggi prolungati con acqua deionizzata contenente HNO_3 allo 0,5%, in modo da minimizzare eventuali effetti memoria. Ripetere la misura di ogni soluzione almeno tre volte ed effettuarne la media. Lavare il sistema con la soluzione di lavaggio tra un campione e l'altro. Al termine della taratura verificare la linearità della risposta strumentale esaminando il coefficiente di correlazione della regressione lineare o valutando la bontà della interpolazione attraverso l'analisi dei residui. Ripetere l'analisi di almeno una soluzione utilizzata per la taratura del metodo verificando che le concentrazioni riscontrate siano comprese tra il 95% e il 105% dei valori attesi, in caso contrario ripetere la taratura.

7.5 Pretrattamento del campione

Per ridurre le interferenze causate dalla presenza di sostanze organiche e per favorire il rilascio di metalli adsorbiti sul particolato in sospensione presenti nel campione, si consiglia di adottare delle procedure di pretrattamento basate sulla digestione del campione.
Si adotta la procedura meno drastica, compatibilmente con la tenacia di ritenzione sui solidi e la degradabilità della sostanza organica.
A questo scopo si utilizzano reattivi ossidanti quali l'acido nitrico, l'acido perclorico o il solforico. L'acido nitrico è preferito sia per le sue capacità ossidanti, sia perchè lo ione nitrato costituisce un buon "background" ai fini delle determinazioni analitiche in spettroscopia di emissione.

7.6 Analisi

Prima di eseguire l'analisi del campione impostare tutti i parametri strumentali seguendo quanto riportato nel manuale operativo dello strumento. Si consiglia di leggere i campioni alternando ad essi delle soluzioni di taratura (ad esempio cinque campioni seguiti dalle soluzioni di taratura). L'analisi dei campioni deve essere eseguita nell'intervallo coperto dalla retta di taratura e sia i campioni che le soluzioni di lavoro devono essere analizzati nelle stesse condizioni strumentali ed effettuando almeno tre letture per ogni soluzione da analizzare. Se il valore riscontrato nella misura di un campione risulta superiore a quello corrispondente alla soluzione di taratura con la maggiore concentrazione, ripetere l'analisi dopo opportuna diluizione del campione stesso. Alcuni problemi analitici sono associabili alla deposizione e/o alla ritenzione per adsorbimento dell'analita sulle superfici costitutive del sistema di introduzione del campione. Lavaggi ragionevolmente protratti fra un campione e l'altro, possono minimizzare o risolvere il problema solo nel caso di ritenzione reversibile o labile. Nel caso di analisi di componenti presenti a basse concentrazioni si raccomandano, pertanto, tempi medi di lavaggio dell'ordine di qualche decina di secondi e quando possibile, l'introduzione dei campioni in ordine crescente di concentrazione.

8. Calcoli

La maggior parte delle apparecchiature disponibili in commercio risultano completamente assistite da mezzi informatici molto sofisticati, pertanto, è possibile condurre le operazioni ana-

litiche (taratura e analisi) in completa automazione, secondo programmi di elaborazione molto versatili. Si rimanda ai manuali operativi delle apparecchiature per ogni dettaglio in merito. I dati analitici vengono espressi in mg/L mediante confronto con le curve di taratura, tenendo conto delle eventuali diluizioni effettuate. Non riportare valori di concentrazione inferiori ai limiti di rivelabilità del metodo.

9. Qualità del dato

Le Tabb. 5a, 5b, 5c riportano, a titolo di esempio, i dati ottenuti in riferimento a campioni di acque naturali, potabili ed effluenti primari da impianti di trattamento. Per ciascuna matrice sono state campionate cinque aliquote, sottoposte ad analisi e le medie delle cinque determinazioni sono state acquisite per la valutazione delle concentrazioni per ciascun analita. Si riporta, inoltre, per ciascun analita, la concentrazione iniziale, la media del recupero percentuale, nonché lo scarto tipo del recupero percentuale, relativamente a 2 aggiunte note a concentrazione differenti per ogni campione.

9.1 Controllo di qualità

Si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni (vedi Appendice 1) attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati tramite apposite carte di controllo. Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".
Caratterizzato il materiale di riferimento non certificato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, è possibile verificare gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX edition, (Washington, APHA).

BETTINELLI M., DEL MONTE M.G. & ZAPPA G. (1993): "Impiego dell'ICP-AES nel Laboratorio Chimico: Criteri per la stesura di metodi normalizzati, *in* C. Minoia, M. Bettinelli, E. Sabbioni, "*Applicazioni dell'ICP-AES nel laboratorio chimico e tossicologico*", Vol.1 Analisi industriali e alimentari, Morgan Edizioni Tecniche, Milano.

BOSS C.B. & FREDEEN K.J. (1997): "*Concept, Instrumentation and Techniques in Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*", Second Edition Perkin Elmer, USA.

BOUMANS P.W.J.M. (1987): "*Inductively coupled plasma emission spectroscopy*. Part 1: *Methodology instrumentation and performance*", Chapter 6, 343-357, J. Wiley e Sons, New York.

GARBARINO J.R. & TAYLOR H.E. (1979): "An inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy method for routine water quality testing", *Appl. Spectroscopy*, 33-39.

MARTIN T.D., BROCKHOFF C.A., CREED J.T. & LONG S.E. (1991): "*Determination of trace elements in water and wastes by inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy*", U.S. EPA Method 200.7.

MOORE G.L. (1989): "*Introduction to Inductively Coupled Plasma Spettrometry*", Elsevier Science Publisher, New York.

THOMPSON M. & WALSH J.N. (1983): *"A Handbook of Inductively Coupled Plasma Spettrometry"*, Blackie e Sone Ltd., London.

U.S. EPA (1979): *"Handbook for analytical quality control in water and wastewater laboratories"*. 600/4-79-019.

U.S.EPA (1992): *"Methods for determination of metals in environmental sample"*, CRC Press Inc., Boca Raton, FL.

Tabella 5a: Esempio di determinazioni analitiche in acque naturali mediante spettroscopia plasma (Martin et al., 1991)

Analita	Conc. iniziale (mg/L)	Conc. aggiunta (mg/L)	Recupero medio (%)	Scarto tipo	Conc. aggiunta (mg/L)	Recupero medio (%)	Scarto tipo
Ag	< LR	0,05	97	0,7	0,2	96	0,2
Al	0,036	0,05	107	7,6	0,2	101	1,1
As	< LR	0,05	107	0,7	0,2	104	0,4
B	0,063	0,1	97	0,6	0,4	98	0,8
Ba	0,102	0,05	102	3,0	0,2	99	0,9
Be	< LR	0,01	100	0,0	0,1	100	0,0
Ca	93,8	5,0	*	*	20,0	100	4,1
Cd	0,002	0,01	90	0,0	0,1	96	0,0
Co	< LR	0,02	94	0,4	0,2	94	0,4
Cr	< LR	0,01	100	7,1	0,1	100	0,4
Cu	0,005	0,02	100	1,1	0,2	96	0,5
Fe	0,042	0,1	99	2,3	0,4	97	1,4
Hg	< LR	0,05	94	2,8	0,2	93	1,2
K	6,21	5,0	96	3,4	20,0	101	1,2
Li	0,001	0,02	100	7,6	0,2	104	1,0
Mg	24,5	5,0	95	5,6	20,0	96	1,6
Mn	2,76	0,01	*	*	0,1	*	*
Mo	< LR	0,02	108	1,8	0,2	101	0,2
Na	35,0	5,0	101	11,4	20,0	100	3,1
Ni	< LR	0,02	112	1,8	0,2	96	0,2
P	0,197	0,1	95	12,7	0,4	98	3,4
Pb	< LR	0,05	87	4,9	0,2	95	0,2
Sb	< LR	0,05	98	2,8	0,2	99	1,4
Se	< LR	0,1	102	0,4	0,4	94	1,1
SiO_2	13,1	5,0	93	4,8	20,0	99	0,8
Sn	< LR	0,05	98	2,8	0,2	94	0,2
Sr	0,274	0,1	94	5,7	0,4	95	1,7
Tl	< LR	0,1	92	0,4	0,4	95	1,1
V	< LR	0,05	98	0,0	0,2	99	0,4
Zn	0,538	0,05	*	*	0,2	99	2,5

< LR = concentrazione inferiore al limite rilevabilità

** = concentrazione dell'aggiunta inferiore al 10% della concentrazione iniziale del campione*

Tabella 5b: Esempio di determinazioni analitiche in acque potabili mediante spettroscopia plasma (Martin et al., 1991)

Analita	Conc. iniziale (mg/L)	Conc. aggiunta (mg/L)	Recupero medio (%)	Scarto tipo	Conc. aggiunta (mg/L)	Recupero medio (%)	Scarto tipo
Ag	< LR	0,05	95	0,7	0,2	96	0,0
Al	0,185	0,05	98	8,8	0,2	105	3,0
As	< LR	0,05	108	1,4	0,2	101	0,7
B	0,023	0,1	98	0,2	0,4	98	0,2
Ba	0,042	0,05	102	1,6	0,2	98	0,4
Be	< LR	0,01	100	0,0	0,1	99	0,0
Ca	35,2	5,0	101	8,8	20,0	103	2,0
Cd	< LR	0,01	105	3,5	0,1	98	0,0
Co	< LR	0,02	100	0,0	0,2	99	0,5
Cr	< LR	0,01	110	0,0	0,1	102	0,0
Cu	< LR	0,02	103	1,8	0,2	101	1,2
Fe	0,008	0,1	106	1,0	0,4	105	0,3
Hg	< LR	0,05	103	0,7	0,2	100	0,4
K	1,98	5,0	109	1,4	20,0	107	0,7
Li	0,006	0,02	103	6,9	0,2	110	1,9
Mg	8,08	5,0	104	2,2	20,0	100	0,7
Mn	< LR	0,01	100	0,0	0,1	99	0,0
Mo	< LR	0,02	95	3,5	0,2	108	0,5
Na	10,3	5,0	99	3,0	20,0	106	1,0
Ni	< LR	0,02	108	1,8	0,2	104	1,1
P	0,045	0,1	102	13,1	0,4	104	3,2
Pb	< LR	0,05	95	0,7	0,2	100	0,2
Sb	< LR	0,05	99	0,7	0,2	102	0,7
Se	< LR	0,1	87	1,1	0,4	99	0,8
SiO_2	6,5	5,0	104	3,3	20,0	96	1,1
Sn	< LR	0,05	103	2,1	0,2	101	1,8
Sr	0,181	0,1	102	3,3	0,4	105	0,8
Tl	< LR	0,1	101	3,9	0,4	101	0,1
V	< LR	0,05	101	0,7	0,2	99	0,2
Zn	0,005	0,05	101	3,7	0,2	98	0,9

< LR = concentrazione inferiore al limite rilevabilità

** = concentrazione dell'aggiunta inferiore al 10% della concentrazione iniziale del campione*

Tabella 5c: Esempio di determinazioni analitiche in acque di scarico (a) mediante spettroscopia plasma (Martin et al., 1991)

Analita	Conc. iniziale (mg/L)	Conc. aggiunta (mg/L)	Recupero medio (%)	Scarto tipo	Conc. aggiunta (mg/L)	Recupero medio (%)	Scarto tipo
Ag	0,009	0,05	92	1,5	0,2	95	0,1
Al	1,19	0,05	*	*	0,2	113	12,4
As	< LR	0,05	99	2,1	0,2	93	2,1
B	0,226	0,1	217	16,3	0,4	119	13,1
Ba	0,189	0,05	90	6,8	0,2	99	1,6
Be	< LR	0,01	94	0,4	0,1	100	0,4
Ca	87,9	5,0	*	*	20,0	101	3,7
Cd	0,009	0,01	89	2,6	0,1	97	0,4
Co	0,016	0,02	95	3,1	0,2	93	0,4
Cr	0,128	0,01	*	*	0,1	97	2,4
Cu	0,174	0,02	98	33,1	0,2	98	3,0
Fe	1,28	0,1	*	*	0,4	111	7,0
Hg	< LR	0,05	102	1,4	0,2	98	0,5
K	10,6	5,0	104	2,8	20,0	101	0,6
Li	0,011	0,02	103	8,5	0,2	105	0,8
Mg	22,7	5,0	100	4,4	20,0	92	1,1
Mn	0,199	0,01	*	*	0,1	104	1,9
Mo	0,125	0,02	110	21,2	0,2	102	1,3
Na	236	5,0	*	*	20,0	*	*
Ni	0,087	0,02	122	10,7	0,2	98	0,8
P	4,71	0,1	*	*	0,4	*	*
Pb	0,015	0,05	91	3,5	0,2	96	1,3
Sb	< LR	0,05	97	0,7	0,2	103	1,1
Se	< LR	0,1	108	3,9	0,4	101	2,6
SiO_2	16,7	5,0	124	4,0	20,0	108	1,1
Sn	0,016	0,05	90	3,8	0,2	95	1,0
Sr	0,515	0,1	103	6,4	0,4	96	1,6
Tl	< LR	0,1	105	0,4	0,4	95	0,0
V	0,003	0,05	93	0,9	0,2	97	0,2
Zn	0,160	0,05	98	3,3	0,2	101	1,0

< LR = concentrazione inferiore al limite rilevabilità

** = concentrazione dell'aggiunta inferiore al 10% della concentrazione iniziale del campione*

(a) = effluenti primari da impianti di trattamento

APPENDICE 1

Definizioni

a) Limite di rivelabilità (LR)

Si definisce come limite di rivelabilità (LR) la concentrazione minima rivelabile di un determinato elemento, cioè la concentrazione minima per la quale si ottiene un segnale distinguibile dal rumore di fondo. I limiti di rivelabilità riportati in letteratura per ICP-AES risultano anche molto diversi, e ciò può dipendere sia dai diversi metodi con cui tali valori sono stati determinati, sia dalle differenti prestazioni analitiche della strumentazione utilizzata. Secondo la IUPAC, si definisce limite di rivelabilità (LR) quella concentrazione di analita che, alla lunghezza d'onda selezionata, produce un segnale d'intensità di emissione chiaro e distinto di ampiezza pari a tre volte lo scarto tipo delle fluttuazioni d'intensità del segnale di fondo. Col

termine "segnale di fondo" si intende il segnale ottenuto per concentrazioni dell'analita pari a zero. Il valore del limite di rivelabilità dipende, pertanto, sia dal potere di rivelabilità strumentale che dall'intensità e stabilità del segnale di fondo. Esso viene spesso utilizzato per valutare le prestazioni strumentali. In condizioni sperimentali ideali, la più bassa concentrazione di analita misurabile in una data matrice non deve essere inferiore a dieci volte il valore del limite di rivelabilità (LR).

b) Concentrazione equivalente al fondo (BEC)

Si definisce concentrazione equivalente al fondo (BEC, Background Equivalent Concentration) quella concentrazione d'analita che, alla lunghezza d'onda selezionata, produce un segnale d'ampiezza pari a quella del segnale di fondo. Il BEC dipende dal potere di rivelabilità dello strumento (coefficiente angolare della curva di taratura) e dall'intensità del segnale di fondo. Esso rappresenta quindi un parametro rapido di determinazione delle prestazioni strumentali. Informazioni analoghe sulla qualità delle prestazioni strumentali vengono fornite dalla misura del rapporto segnale/fondo (SBR, "Signal Background Ratio"), ovvero del rapporto tra il segnale netto dell'intensità di emissione prodotto ad una determinata lunghezza d'onda da una soluzione di riferimento dell'elemento in esame ed il corrispondente segnale di fondo. Il parametro SBR, contrariamente al BEC, viene riferito ad una determinata concentrazione di analita (generalmente 1 oppure 10 $mg \cdot L^{-1}$).

c) Precisione a breve termine (CV%)

Uno dei parametri importanti per valutare se lo spettrometro sia in grado di effettuare una determinata misura, è la precisione a breve termine del segnale emesso durante tale misura, intesa come l'accordo tra misure dello stesso tipo, effettuate ripetutamente ed a breve distanza l'una dall'altra sul medesimo campione. La precisione a breve termine (CV%) viene determinata calcolando lo scarto tipo delle misure ripetute ed è espressa come percentuale del valore medio. La precisione massima si ottiene quando la concentrazione dell'analita è compresa tra 100 e 1000 volte il valore del limite di rivelabilità. In tali condizioni, ed assumendo un tempo di integrazione di 3 s, il valore CV% risulta compreso tra 0,2 e 0,5%. Per concentrazioni minori e comprese tra 10 e 100 volte il limite di rivelabilità, il CV% deve risultare inferiore o uguale al 5%. Per concentrazioni pari al limite di rivelabilità, il CV% risulta dell'ordine del 50%. Il livello di precisione a breve termine dello strumento, considerato accettabile per un determinato metodo analitico, viene definito con due valori CV% massimi ammissibili da accertare in corrispondenza del limite inferiore e del limite superiore del campo delle determinazioni analitiche. Tali valori possono variare in funzione del tipo di campione utilizzato, della concentrazione dell'elemento in esame e delle condizioni sperimentali, ma dovranno comunque essere compresi nell'intervallo tra il 5% e il 15% in corrispondenza del limite inferiore e tra l'1% e il 2% in corrispondenza del limite superiore delle determinazioni analitiche.

d) Precisione a lungo termine

Per verificare la stabilità nel tempo del segnale di emissione si determina lo scarto tipo di una serie di misure effettuate sullo stesso campione in un arco temporale esteso. Esso consente di controllare la validità delle determinazioni effettuate a tempi diversi, senza tarature successive fra una serie di misure e l'altra. La mancata stabilità strumentale in intervalli di tempo prolungati può essere risolta mediante verifica e correzione periodica delle procedure di taratura strumentale.

e) Linearità della curva di taratura

Le curve di taratura analitica hanno un andamento lineare su un ampio intervallo di concentrazione che si estende dal valore del limite di rivelabilità sino a concentrazioni superiori di quattro o cinque ordini di grandezza. Per la maggior parte degli elementi la linearità della curva è soddisfacente sino a valori di concentrazione dell'analita pari a 1000 mg L^{-1}. Una

buona linearità delle curve di taratura analitica rende il metodo più rapido perchè riduce al minimo le operazioni di diluizione del campione e, conseguentemente, il volume delle soluzioni occorrente per la taratura analitica.

APPENDICE 2

Raccomandazioni sull'uso in sicurezza di uno spettrometro a emissione al plasma

Lo spettrometro a emissione al plasma non è considerato uno strumento a rischio per l'operatore e tuttavia va utilizzato con le dovute precauzioni onde evitare possibili effetti nocivi dovuti ai fumi, al calore ed alle radiazioni ultraviolette emesse. Le sorgenti al plasma emettono infatti radiofrequenze e una intensa radiazione ultravioletta che deve essere opportunamente schermata. I fumi che accompagnano la decomposizione della soluzione iniettata nel plasma e le piccole quantità di ozono generate dalla radiazione ultravioletta devono essere rimossi dall'atmosfera del laboratorio installando sopra la zona di lavoro un opportuno sistema di aspirazione dotato di relativi filtri idonei all'intrappolamento delle emissioni prodotte. È inoltre consigliabile schermare la torcia dal lato dell'operatore in quanto le radiazioni ultraviolette emesse dal plasma possono essere dannose per la pelle e per gli occhi. In assenza di precisi accertamenti della pericolosità delle radiofrequenze in gioco, è sempre consigliabile mantenere a livelli quanto più bassi possibili le radiazioni emesse dal generatore e la potenza riflessa. Particolare cura è necessaria nella manipolazione di campioni di acque reflue o comunque biologicamente attive a causa della potenziale presenza di agenti patogeni. Si raccomanda l'adozione di comuni norme antinfortunistiche, nonché l'uso di guanti, occhiali e ausilii di protezione personale.

3030. Determinazione di cationi (sodio, ammonio, potassio, magnesio, calcio) mediante cromatografia ionica

1. Principio del metodo

Il metodo è basato sulla determinazione simultanea di specie cationiche mediante cromatografia ionica. Questa tecnica si basa sulla separazione degli analiti mediante colonna di scambio cationico in base alla loro affinità per la fase stazionaria.
Il riconoscimento degli analiti, rivelati mediante conduttimetro in linea, viene effettuato confrontando il tempo di ritenzione dei picchi del campione con il tempo di ritenzione di soluzioni di riferimento. La concentrazione viene determinata confrontando l'area del picco con la curva di taratura dell'analita costruita mediante una serie di soluzioni di riferimento a diverse concentrazioni.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile alle acque dolci naturali (superficiali, sotterranee, potabili, minerali e meteoriche), alle acque trattate ed agli scarichi domestici ed industriali. Il campo di applicazione, utilizzando un volume di iniezione di 25 µL, è compreso tra 0,1 e 100 mg/L per calcio, tra 0,1 e 50 mg/L per magnesio, tra 0,1 e 30 mg/L per sodio e potassio, e tra 0,1 e 10 mg/L per ammonio.
Campioni che presentano concentrazioni più elevate possono essere analizzati dopo un'opportuna diluizione. Campioni aventi concentrazione inferiore al limite di applicabilità (0,1 mg/L) possono essere analizzati aumentando il "loop" di iniezione fino a 200 µL.

3. Interferenze e cause di errore

Sostanze con tempi di ritenzione simili a quelli degli analiti di interesse possono interferire con la determinazione, specie se presenti in elevate quantità. Questo tipo di interferenza, facilmente individuabile nei cromatogrammi per la presenza di picchi parzialmente sovrapposti, è dipendente dalla fase stazionaria e dalla forza dell'eluente. Ogni qual volta si verifichi un evento del genere, è necessario modificare la forza dell'eluente oppure cambiare il tipo di colonna, secondo le indicazioni delle case produttrici. In questo paragrafo vengono descritte le più comuni interferenze riscontrabili nelle analisi effettuate con i modelli più diffusi di colonne a scambio cationico.
Nel caso di campioni nei quali gli analiti siano vicini all'estremo superiore del campo di applicabilità, si possono avere interferenze tra i picchi degli analiti stessi. In questo caso è necessario ottimizzare la separazione per ottenere un fattore di risoluzione, R>1. Una soluzione alternativa è la diluizione del campione stesso o la diminuzione del volume di iniezione.
La risoluzione tra sodio e ammonio è problematica per la maggior parte delle fasi stazionarie in commercio, soprattutto quando il sodio è presente in quantità notevolmente superiori all'ammonio.
In funzione della selettività della colonna, il manganese, quando presente in concentrazioni dell'ordine di mg/L, può interferire col picco di magnesio e calcio. Questa situazione si può verificare ad esempio in acque lacustri anossiche o in acque di scarico.
In caso di presenza di sostanze organiche con elevata affinità per resine scambiatrici ioniche a base aromatica, come polifenoli, tensioattivi, acidi umici, può essere necessario purificare il campione mediante filtrazione su cartucce, a base di polivinilpirrolidone polimerizzato, re-

sine macroporose di divinilbenzene o equivalenti, in grado di trattenere selettivamente questo tipo di sostanze. La presenza di queste sostanze si evidenzia sul cromatogramma come disturbi o picchi molto allargati sulla linea di base, a carattere non periodico.
L'analisi frequente di campioni contenenti metalli disciolti può portare col tempo alla perdita delle caratteristiche di efficienza e risoluzione della colonna: è consigliabile purificare questo tipo di campioni mediante filtrazione su cartucce in grado di sequestrare metalli, disponibili commercialmente.
Per campioni contenenti particolato sospeso, si consiglia la filtrazione attraverso filtri da 0,45 µm prima dell'iniezione.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il prelievo del campione deve essere effettuato in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". A causa dei piccoli volumi analizzati, si deve prestare particolare cura nella manipolazione dei campioni al fine di non introdurre contaminazione negli stessi.
Sodio e potassio sono stabili in soluzione. Calcio e magnesio possono precipitare come carbonati. La concentrazione di ammonio può essere affetta dall'attività biologica del campione. Pertanto per conservare il campione è necessario acidificare con acido nitrico intorno a pH 3. I campioni devono essere analizzati nel minor tempo possibile dopo il prelievo (al più tardi entro 48 h per l'ammonio), mantenendo gli stessi fino al momento dell'analisi a 4°C. I recipienti utilizzati per la conservazione dei campioni devono essere necessariamente in materiale plastico, quali, ad esempio, polietilene.

5. Apparecchiature

5.1 Vetreria di laboratorio di classe A

5.2 Cromatografo ionico, costituito da pompa isocratica capace di fornire un flusso da 0,5 a 2,5 mL/min; rivelatore a conducibilità con compensazione della temperatura. "Loop" di iniezione da 20 a 200 µL.

5.3 Colonna di separazione a scambio cationico

Colonna impaccata con resine pellicolari a bassa capacità, funzionalizzate con gruppi solfonici o carbossilici, supportate su polimero a base aromatica, con relativa precolonna di fase analoga, in grado di dare una separazione efficiente dei picchi degli analiti. La colonna scelta deve essere in grado di fornire un'adeguata efficienza e risoluzione nella separazione dei picchi degli analiti: i valori accettabili dei parametri cromatografici (ad una concentrazione di 1 mg/L per ciascun analita) sono i seguenti:

fattore di capacità:	$0,5<k<12$
efficienza:	N>2000 piatti teorici
fattore di risoluzione:	R>1
fattore di asimmetria:	$0<A_s<4$

Il calcolo di tutti i parametri cromatografici della colonna deve essere effettuato almeno due volte l'anno; per matrici più complesse la verifica deve essere più frequente. Nel caso in cui la colonna non presenti più requisiti cromatografici sufficienti, si deve procedere al lavaggio e rigenerazione della colonna secondo le istruzioni della casa costruttrice, o alla sostituzione della medesima.

5.4 Sistema di acquisizione dati, mediante personal computer o integratore.

6. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere di grado analitico. Le soluzioni devono essere preparate con acqua ad elevata purezza, caratterizzata da conducibilità specifica <0,1 µS/cm e filtrata su membrana da 0,2 µm.

6.1 Reattivi per la preparazione della miscela eluente secondo le indicazioni della casa produttrice della colonna (ad esempio acido metansolfonico, acido tartarico, ecc.)

6.2 Nitrato di calcio tetraidrato ($Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$)

6.3 Nitrato di magnesio esaidrato ($Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$)

6.4 Nitrato di potassio (KNO_3)

6.5 Nitrato di sodio ($NaNO_3$)

6.6 Solfato di ammonio ($(NH_4)_2SO_4$)

6.7 Acido nitrico concentrato (HNO_3)

6.8 Soluzione eluente

La soluzione eluente e la sua molarità deveno essere scelte secondo le indicazioni della casa produttrice della colonna.
È consigliabile degasare l'eluente durante l'analisi. L'eluente deve essere preparato fresco ogni qual volta si inizi una sessione di analisi.

6.9 Soluzioni di riferimento concentrate

Preparare una serie di soluzioni concentrate di 1000 mg/L di analita, pesando i rispettivi sali conservati in essiccatore. Queste soluzioni, acidificate a pH 3 con acido nitrico e conservate a 4°C al buio in bottiglie di polietilene o polipropilene, sono stabili 6 mesi.

6.9.1 Soluzione di riferimento concentrata di ammonio (1000 mg/L)

Sciogliere in acqua 3,667 g di solfato di ammonio (6.6), precedentemente essiccato in stufa per almeno 30 min a 105°C, in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua.

6.9.2 Soluzione di riferimento concentrata di calcio (1000 mg/L)

Sciogliere in acqua 5,892 g di nitrato di calcio tetraidrato (6.2) in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua.

6.9.3 Soluzione di riferimento concentrata di magnesio (1000 mg/L)

Sciogliere in acqua 10,549 g di nitrato di magnesio esaidrato (6.3) in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua.

6.9.4 Soluzione di riferimento concentrata di potassio (1000 mg/L)

Sciogliere in acqua 2,586 g di nitrato di potassio (6.4), precedentemente essiccato in stufa per almeno 30 min a 105°C, in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua.

6.9.5 Soluzione di riferimento concentrata di sodio (1000 mg/L)

Sciogliere in acqua 3,698 g di nitrato di sodio (6.5), precedentemente essiccato in stufa per almeno 30 min a 105°C, in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua. In sostituzione delle precedenti, si possono usare soluzioni commerciali di opportuna concentrazione, purché in corso di validità e accompagnate da un certificato di analisi che consenta la riferibilità della misura a campioni primari.

7. Procedimento

7.1 Ottimizzazione dei parametri strumentali

Portare tutte le soluzioni di riferimento, i campioni, l'eluente e l'eventuale rigenerante a temperatura ambiente prima di iniziare ogni analisi. Poiché la temperatura influenza i parametri cromatografici, è preferibile mantenere la temperatura del laboratorio controllata durante lo svolgimento della taratura e delle successive analisi.
Accendere il cromatografo, impostare le condizioni strumentali di lavoro, lasciare stabilizzare il sistema per almeno 30 minuti, e controllare che la conducibilità sia stabile.

7.1.1 Condizioni cromatografiche

Le condizioni strumentali da controllare sono: il volume d'iniezione, la composizione dell'eluente, il flusso dell'eluente, la conducibilità di fondo, la pressione del sistema. È inoltre importante verificare che sia impostato sul rivelatore il fattore di compensazione della temperatura.
Nel caso di un soppressore chimico si deve definire e controllare anche il flusso del rigenerante.

7.1.2 Verifica della funzionalità strumentale

Raggiunte le condizioni d'analisi, deve essere verificata la perfetta funzionalità strumentale mediante l'iniezione di una soluzione di riferimento, a scelta all'interno dell'intervallo di lavoro. Bisogna verificare la risoluzione tra i picchi e la riproducibilità dei tempi di ritenzione (massimo scostamento ammissibile rispetto all'ultimo controllo dell'efficienza: ±5%) dei singoli analiti. È necessario, inoltre, verificare mediante l'iniezione di un campione d'acqua ad elevata purezza (considerato come bianco) la presenza di eventuali interferenti dovuti al sistema.

7.2 Taratura

La scelta delle modalità di taratura dipende dall'intervallo di concentrazioni che si vuole analizzare con una singola taratura. Nel caso di sodio, potassio, calcio e magnesio, per intervalli di concentrazioni fino a due ordini di grandezza è possibile utilizzare curve di taratura lineari con almeno tre punti. A seconda della tipologia dei campioni può essere necessario coprire l'intervallo di misura con due rette di taratura.
Se si evidenzia uno scostamento dalla linearità (R^2<0,999, oppure variazione dei valori dei fattori di risposta[1], RF, più elevata del ±5% attorno al valore medio di RF), è consigliabile interpolare i punti dalle soluzioni di riferimento con una curva di taratura quadratica. Nel caso dell'ammonio, lo scostamento dalla linearità è più evidente e si consiglia quindi l'utilizzo di una regressione quadratica.
Per le tarature lineari è necessario preparare tre soluzioni di riferimento a concentrazioni cor-

[1] Il fattore di risposta RF può essere facilmente calcolato per ogni concentrazione delle soluzioni di riferimento come: (Area del picco)/(concentrazione della soluzione di riferimento) = RF.
In caso di perfetta linearità della curva di taratura e di intercetta nulla i valori di RF sono uguali per ogni valore di concentrazione.

rispondenti ai due estremi ed al centro dell'intervallo di misura. Ad esempio, per sodio e potassio è possibile dividere l'intervallo di misura definito dall'intero campo di applicabilità del metodo (0,1-30 mg/L) in due intervalli (0,1-1; 0,5-30 mg/L); per ciascuno dei due intervalli si devono preparare ed iniettare tre soluzioni di riferimento (per l'intervallo 0,1-1 le soluzioni devono essere a concentrazione 0,1 mg/L; 0,5 mg/L; 1 mg/L). Ad esempio, per il magnesio è possibile dividere l'intervallo di misura (0,1-50 mg/L) in due intervalli (0,1-1; 0,5-50 mg/L); per ciascuno dei due intervalli si devono preparare ed iniettare tre soluzioni di riferimento (per l'intervallo 0,5-50 le concentrazioni delle soluzioni di riferimento devono essere 0,5 mg/L; 25 mg/L; 50 mg/L). Ad esempio, per il calcio è possibile dividere l'intervallo di misura (0,1-100 mg/L) in due intervalli (0,1-1; 1-100 mg/L); per ciascuno dei due intervalli si devono preparare ed iniettare tre soluzioni di riferimento (a concentrazione 1 mg/L; 50 mg/L; 100 mg/L per l'intervallo 1-100 mg/L).
Per l'ammonio sono accettabili curve di taratura lineari solo per un ordine di grandezza, dividendo l'intero campo di applicabilità del metodo (0,1-10 mg/L) in due intervalli (0,1-1; 1-10 mg/L); per ciascuno dei due intervalli si devono preparare ed iniettare tre soluzioni di riferimento (per l'intervallo 0,1-1 le soluzioni di riferimento devono essere a concentrazione 0,1 mg/L; 0,5 mg/L; 1 mg/L). Per le determinazioni su due ordini di grandezza con una sola taratura, è indispensabile ricorrere ad una regressione quadratica, calcolata con almeno cinque punti. Le soluzioni di taratura vanno scelte in corrispondenza del valore minimo, massimo, del 5, 10 e 50% dell'intervallo di misura (ad esempio per l'intervallo 0,1-10 mg/L le concentrazioni consigliate sono 0,1 mg/L; 0,5 mg/L; 1 mg/L; 5 mg/L e 10 mg/L).
La preparazione delle soluzioni di taratura multielemento, a partire dalle soluzioni concentrate da 1000 mg/L (6.9), deve essere eseguita aggiungendo accuratamente, in funzione della concentrazione degli analiti desiderati, volumi misurati di soluzioni concentrate in matracci tarati, portando a volume con acqua.
Le soluzioni di taratura a concentrazione bassa (≤1 mg/L) devono essere preparate giornalmente mentre quelle a concentrazione più elevata (>1 mg/L) possono essere utilizzate per due settimane.

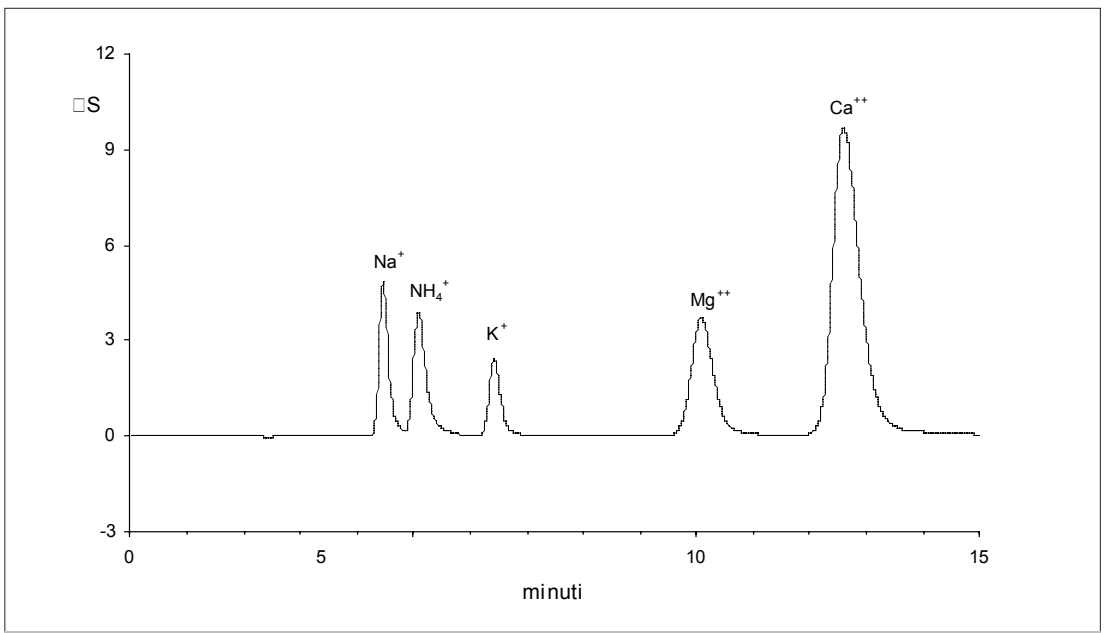


Figura 1: Esempio di cromatogramma di una soluzione di riferimento multipla di sodio, ammonio, potassio e magnesio 2 mg/L, calcio 10 mg/L. Volume di iniezione 50 µL; eluente 20 mM acido metansolfonico; flusso 1 mL/min; colonna Dionex IonPac CS12A Analytical Column (4 mm); soppressore Cation Self-Regenerating Suppressor II.

Iniettare un'aliquota della prima soluzione di riferimento ed acquisire il cromatogramma. Il volume di iniezione deve essere uguale per soluzioni di riferimento e campioni. Quando si usa un sistema di iniezione con "loop", esso deve essere condizionato con almeno 3 volumi

di campione prima dell'iniezione. L'iniezione può essere effettuata con una siringa o un autocampionatore. Nel caso si usi una siringa di plastica, questa deve essere risciacquata con acqua deionizzata ed avvinata 2 volte con la soluzione d'analisi prima dell'iniezione. La stessa procedura deve essere adottata per le fiale dell'autocampionatore.
Ripetere l'operazione per le altre soluzioni in modo da costruire una curva di taratura. Verificare la curva di taratura, almeno ogni 25 campioni e alla fine della sessione di analisi, mediante l'iniezione di soluzione di riferimento di controllo avente concentrazione compresa nell'intervallo di lavoro.
Se il valore dell'area della soluzione di riferimento di controllo iniettato si discosta per ±5% dal valore dell'area della stessa soluzione di riferimento utilizzata per la curva di taratura, è necessario ripetere la taratura.

7.3 Determinazione

Iniettare un'aliquota del campione ed acquisire il cromatogramma. Per l'iniezione dei campioni bisogna attenersi alle stesse condizioni descritte per le soluzioni di riferimento al Paragrafo 7.2.
Il riconoscimento qualitativo dei cationi viene effettuato per confronto con i tempi di ritenzione delle soluzioni di riferimento di taratura. Nei casi dubbi è necessario assicurarsi della corretta attribuzione effettuando un'aggiunta nota dell'analita al campione e verificando che vi sia un aumento dell'altezza del picco cromatografico relativo.
Completata l'identificazione qualitativa dei picchi, si procede all'analisi quantitativa ricavando le concentrazioni dalla curva di taratura.
Nel caso la concentrazione del campione oltrepassi il limite superiore della taratura, utilizzare delle soluzioni di taratura a maggiore concentrazione nei limiti imposti dal campo di applicazione del metodo (vedi Capitolo 2). Per concentrazioni superiori si deve diluire il campione.
Campioni aventi concentrazione inferiore al limite di applicabilità (0,1 mg/L) possono essere analizzati aumentando il loop di iniezione fino a 200 µL. La preparazione delle soluzioni di riferimento e la taratura in questo intervallo di concentrazioni è però molto delicata; si consiglia di operare la taratura con cinque soluzioni di riferimento nell'intervallo 0,01-0,1 mg/L.

8. Calcoli

La concentrazione dei cationi nel campione si ricava dalla curva di taratura costruita per ciascun analita.

9. Qualità del dato

Il metodo è stato validato mediante un esercizio di interconfronto condotto da 11 laboratori italiani qualificati appartenenti ad enti pubblici e privati. Questo esercizio è stato effettuato analizzando tre campioni multicomponenti sintetici di acque di pioggia e acque superficiali (RIDEP-92, AQUACON-A97, AQUACON-B97), utilizzati in precedenti esercizi di interconfronto, e un campione certificato (acqua di pioggia artificiale NBS2694-II) fornito dal National Institute of Standards (NIST). Dall'analisi ANOVA dei dati ottenuti dai laboratori, dopo eliminazione degli "outlier" secondo procedure standardizzate, si sono ricavate la ripetibilità e la riproducibilità del metodo alle concentrazioni in esame in matrici sintetiche (Tab. 1).
L'accuratezza del metodo è stata dimostrata confrontando i valori medi di concentrazione per gli analiti, ottenuti nell'esercizio di interconfronto, coi valori attesi o certificati dei campioni (Tab. 2).

Tabella 1: Risultati delle prove di validazione interlaboratorio: ripetibilità e riproducibilità. Media (X), deviazione standard della ripetibilità (s_r), deviazione standard della riproducibilità (s_R), limite di ripetibilità (r); limite di riproducibilità (R) espressi in mg/L e calcolati secondo le norme ISO 5725.

	n lab	n lab senza outlier	% outlier	X	s_r	CV	s_R	CV	[a]r	[b]R
Sodio										
NBS-II	7	6	14,3	0,40	0,015	3,8	0,021	5,3	0,042	0,059
RIDEP92	9	9	0	0,17	0,013	7,6	0,020	11,8	0,036	0,056
AQUACON-A97	7	5	28,6	2,19	0,032	1,5	0,069	3,2	0,090	0,190
AQUACON-B97	9	9	0	4,10	0,100	2,4	0,200	4,9	0,280	0,560
Ammonio										
NBS-II	6	6	0	0,91	0,045	4,9	0,063	6,9	0,130	0,180
RIDEP92	7	6	14,3	0,44	0,022	5,0	0,025	5,7	0,062	0,070
Potassio										
NBS-II	7	6	14,3	0,11	0,025	22,7	0,032	29,1	0,070	0,090
RIDEP92	9	7	22,2	0,24	0,014	5,8	0,023	9,6	0,039	0,064
AQUACON-A97	7	6	14,3	1,97	0,050	2,5	0,110	5,4	0,140	0,300
AQUACON-B97	9	9	0	2,30	0,170	7,3	0,180	7,9	0,480	0,520
Magnesio										
NBS-II	6	5	16,7	0,052	0,004	8,3	0,005	10,4	0,012	0,015
RIDEP92	8	7	12,5	0,100	0,007	7,0	0,010	10,0	0,020	0,028
AQUACON-A97	6	5	16,7	2,230	0,066	3,0	0,083	3,7	0,180	0,230
AQUACON-B97	9	9	0	5,200	0,160	3,1	0,200	3,8	0,450	0,560
Calcio										
NBS-II	5	5	0	0,067	0,022	32,8	0,037	55,2	0,062	0,10
RIDEP92	8	8	0	0,190	0,019	10,0	0,055	28,9	0,053	0,15
AQUACON-A97	7	7	0	23,6	0,770	3,3	0,830	3,5	2,200	2,30
AQUACON-B97	9	9	0	41,8	0,920	2,2	1,300	3,2	2,600	3,70

[a] $r = 2,8\ s_r$

[b] $R = 2,8\ s_R$

Tabella 2: Risultati delle prove di validazione interlaboratorio: accuratezza. Confronto tra l'intervallo di confidenza (CI = X ± r), col valore certificato o atteso (μ ± σ) espressi in mg/L e calcolati secondo le norme ISO 5725.

	X	r	μ	σ
		Sodio		
NBS-II	0,40	0,042	0,419	0,0015
RIDEP92	0,17	0,036	0,200	0,0100
AQUACON-A97	2,19	0,090	2,200	0,1000
AQUACON-B97	4,10	0,280	4,100	0,1000
		Ammonio		
NBS-II	0,91	0,130	1,0*	-
RIDEP92	0,44	0,062	0,49	0,02
		Potassio		
NBS-II	0,11	0,070	0,106	0,008
RIDEP92	0,24	0,039	0,290	0,010
AQUACON-A97	1,97	0,140	2,000	0,100
AQUACON-B97	2,30	0,480	2,400	0,100
		Magnesio		
NBS-II	0,052	0,012	0,051	0,003
RIDEP92	0,100	0,020	0,100	0,010
AQUACON-A97	2,200	0,180	2,300	0,100
AQUACON-B97	5,200	0,450	5,100	0,100
		Calcio		
NBS-II	0,067	0,062	0,049	0,011
RIDEP92	0,190	0,053	0,200	0,020
AQUACON-A97	23,600	2,200	24,000	0,400
AQUACON-B97	41,800	2,600	41,600	0,700

** valori indicativi non certificati*

BIBLIOGRAFIA

ISO (1994): "*Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results*", Method 5725, ISO, Geneva.

ISO (1998): "*Water quality. Determination of dissolved* Li^+, Na^+, NH_4^+, K^+, Mn^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Sr^{2+} *and* Ba^{2+} *using ion chromatography – Method for water and waste water*", Proposal for method ISO/DIS 14911, Geneva.

IUPAC (1995): "Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies", *Pure & Appl. Chem.*, **67,** 331-343.

MOSELLO R., BIANCHI M., GEISS H., MARCHETTO A., MORSELLI L., MUNTAU H., SERRINI G., SERRINI LANZA G. & TARTARI G.A., (1993): "Italian network for the chemistry of atmospheric deposition, n. 10, Intercomparison 1/92", *Documenta Ist. Ital. Idrobiol.*, 40, 49 pp.

MOSELLO R., BIANCHI M., GEISS H., MARCHETTO A., SERRINI G., SERRINI LANZA G., TARTARI G.A. & MUNTAU H., (1998): "AQUACON-MedBas Project, Subproject N°5 Freshwater analysis, Intercomparison 1/97", Joint Res, Centre European Commission, *Rep, EUR 18075 EN*, 66 pp.

YOUDEN W.J. & STEINER E.H. (1975): "*Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists*", AOAC, Arlington, VA.

APPENDICE

1. Valutazione dei parametri cromatografici di una separazione

1.1 Valutazione del fattore di capacità k

Definendo un *tempo di ritenzione corretto*

$$t'_r = t_r - t_m$$

ove t_r è il tempo di ritenzione dell'analita e t_m il tempo necessario alla fase mobile per arrivare al rivelatore, si può calcolare il *fattore di capacità*:

$$k = t'_r/t_m$$

1.2 Valutazione del fattore di risoluzione R

La risoluzione R tra due picchi si calcola, in accordo con la Farmacopea statunitense (USP), secondo la seguente equazione:

$$R_{2,1} = \frac{2\cdot(t_{R2}-t_{R1})}{(W_{2b}+W_{1b})}$$

$R_{2,1}$	è la risoluzione tra la coppia di picchi 2,1
t_{R1}	è il tempo di ritenzione, in secondi, del primo dei due picchi
t_{R2}	è il tempo di ritenzione, in secondi, del secondo picco
W_{1b}	è l'ampiezza alla base del primo picco, misurato in secondi sulla scala dei tempi
W_{2b}	è l'ampiezza alla base del secondo picco, misurato in secondi sulla scala dei tempi

W_{1b}, W_{2b} sono le ampiezze alla base del triangolo isoscele costruito sul picco Gaussiano, generato tracciando le tangenti ai punti di flesso (Fig. 1).

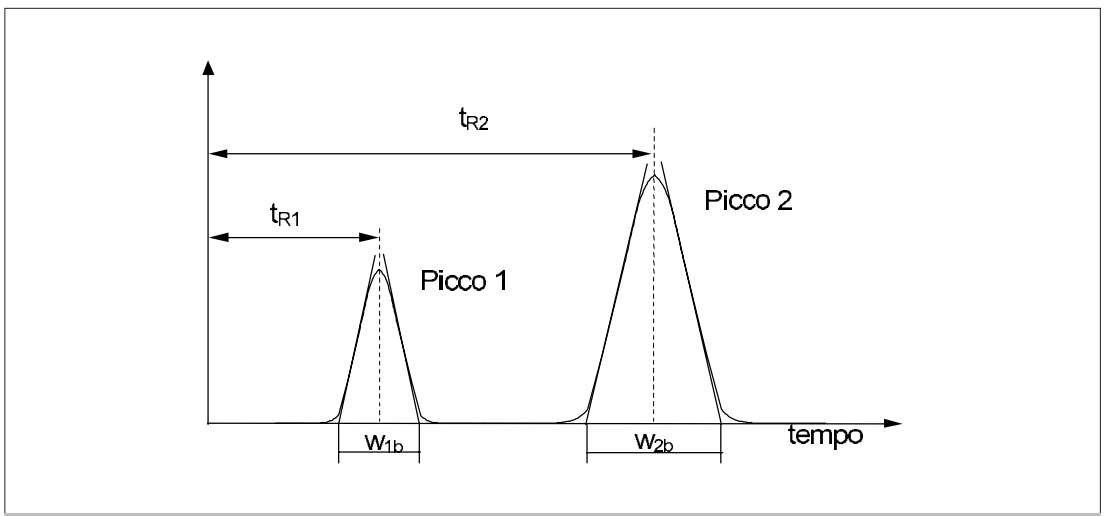


Figura 1: Rappresentazione grafica del calcolo della risoluzione R tra due picchi.

1.3 Valutazione dell'efficienza

L'efficienza della colonna può essere espressa in *numero di piatti teorici*, *N*, calcolati secondo la seguente equazione:

$$N = 16\ (t_r/w_b)^2$$

dove:
t_r = tempo di ritenzione dell'analita;
w_b = ampiezza alla base del picco, misurato in secondi sulla scala dei tempi.

1.4 Valutazione del fattore di asimmetria A_s

La simmetria dei picchi viene espressa, quantitativamente, dall'equazione:

$$A_s = b/a$$

ove *b* e *a* sono le distanze della curva dalla verticale nel punto di massimo, misurate al livello del 10% dell'altezza del picco, rispettivamente dopo e prima del punto di massimo (Fig. 2).

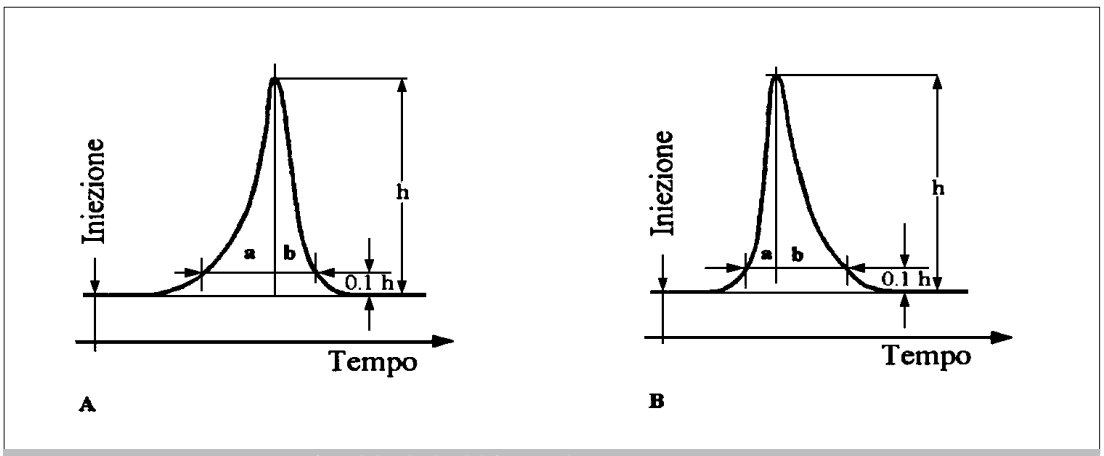


Figura 2: Rappresentazione grafica del calcolo del fattore di asimmetria.

3040. Metodi di preconcentrazione per la determinazione di metalli in tracce

I procedimenti analitici utilizzati per l'analisi degli elementi in tracce nelle acque superficiali incontaminate (dolci e di mare) e nelle acque sotterranee richiedono in alcuni casi uno stadio preliminare di preconcentrazione che permetta da un lato di aumentare sensibilmente il limite di rivelabilità e dall'altro di minimizzare gli effetti negativi dovuti a potenziali interferenti e alla matrice stessa.
I procedimenti di preconcentrazione descritti nel seguito (Metodo A - complessazione con ammonio pirrolidinditiocarbammato (APDC), estrazione del complesso con cloroformio ed estrazione di ritorno in ambiente acido; Metodo B – estrazione in fase solida mediante resina Chelex-100) sono di tipo generale e consentono di concentrare con rese soddisfacenti un numero elevato di analiti; altre procedure di preconcentrazione, applicabili all'analisi di particolari analiti, verranno descritte nelle sezioni specifiche ad essi relative. Tra queste la procedura modificata di estrazione con APDC per il tallio (Sezione 3290 Metodo B) e la procedura di coprecipitazione con idrossido ferrico descritta per il cromo (Sezione 3150 Metodo B4) e per il vanadio (Sezione 3310 Metodo B).

METODO A - Complessazione con ammonio pirrolidinditiocarbammato (APDC), estrazione con cloroformio ed estrazione di ritorno in ambiente acido

Il procedimento di preconcentrazione proposto consiste nella chelazione del metallo con ammonio pirrolidinditiocarbammato (APDC), successiva estrazione del complesso con cloroformio e riestrazione dalla fase organica con acido nitrico. L'analita in presenza di APDC viene trasformato in una specie non carica solubile nel solvente organico, per sostituzione delle molecole d'acqua ad esso coordinate con il gruppo legante. La successiva estrazione della fase organica in ambiente acido permette di eliminare i problemi causati dalla instabilità del complesso e di ottenere invece una soluzione acida stabile e conservabile per lungo tempo prima dell'analisi strumentale.
Questa tecnica, utilizzando condizioni di pH adeguati, consente di concentrare i più comuni metalli di interesse ambientale (Ag, Cd, Co, Cr(VI), Cu, Pb, Tl, Zn) con rese di estrazione dell'ordine del 50-100%. Il procedimento è caratterizzato da rapidità, semplicità ed elevati fattori di concentrazione.
Le rese di estrazione sono fortemente dipendenti dalle caratteristiche delle matrici analizzate (acque superficiali e acque estuarine); per questo motivo è indispensabile utilizzare il metodo delle aggiunte note.
A differenza dei metodi strumentali in via diretta, questo metodo, prevedendo una certa manipolazione del campione comporta rischi di contaminazione che vanno il più possibile contenuti anche prestando particolare attenzione alla purezza dei reattivi impiegati. Dovranno essere altresì seguite le norme precauzionali relative all'uso di sostanze organiche tossiche.

1. Principio del metodo

Il metodo si basa sulla chelazione di ioni metallici con APDC, successiva estrazione del complesso con cloroformio e riestrazione dalla fase organica con acido nitrico. Poiché l'efficienza dell'estrazione del complesso Me-APDC e la solubilità del cloroformio in acqua sono legate alla conducibilità e alla temperatura, è necessario il ricorso alle aggiunte note. La complessazione e l'estrazione sono possibili in un ampio intervallo di pH; ma si preferisce ope-

rare tra pH 4 e 5 per avere una procedura utile contemporaneamente per più analiti ed una maggiore stabilità dei complessi. L'estrazione della fase organica in ambiente acido permette di ottenere una soluzione acida stabile e conservabile prima dell'analisi strumentale che può essere condotta in spettrometria di assorbimento atomico con fornetto di grafite (ETA-AAS) o in alternativa mediante spettrometria di emissione atomica al plasma (ICP-OES) oppure spettrometria di assorbimento atomico in fiamma (F-AAS).

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile a matrici diverse incluse le acque superficiali e acque estuarine e consente dopo la preconcentrazione (generalmente si concentra di un fattore 50) la determinazione di bassi livelli di concentrazione (inferiori al µg/L) di Ag, Cd, Co, Cr (VI), Cu, Pb, Tl, Zn.

3. Interferenze e cause di errore

La maggior parte delle interferenze viene praticamente rimossa anche se l'estrazione lascia in soluzione diverse sostanze potenzialmente interferenti.
Il ricorso al metodo delle aggiunte note permette di effettuare delle determinazioni accurate e di minimizzare le interferenze di matrice, ed inoltre l'utilizzo del correttore di fondo (per ETA-AAS e F-AAS) consente di minimizzare gli assorbimenti aspecifici eventualmente presenti.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". In particolare, considerando le basse concentrazioni da determinare, si consiglia di conservare i campioni in bottiglie di polietilene o altro materiale caratterizzato da scarsa capacità di cessione o adsorbimento di metalli, precedentemente trattate con HNO_3 1 M per una notte e successivamente risciacquate con acqua ad elevato grado di purezza.
Per determinare soltanto il metallo disciolto, il campione viene filtrato dopo il prelievo, su membrana da 0,45 µm (acetato di cellulosa o policarbonato) e sottoposto a procedimento di estrazione. Se il procedimento di estrazione non può essere effettuato entro 24 ore è consigliabile acidificare il campione filtrato con HNO_3 fino a pH 2. Occorre comunque tenere presente che la stabilizzazione in ambiente acido può produrre alterazioni nella speciazione del cromo, favorendo una riduzione del Cr (VI) a Cr (III).
La concentrazione del metallo totale può essere ottenuta dalla somma del metallo solubile, più il metallo presente nella fase particolata.
È buona norma considerare sempre l'opportunità di predisporre un "bianco di campo", ottenuto semplicemente mediante lo stoccaggio di un'aliquota di acqua ultrapura in un recipiente identico a quello dei prelievi, da sottoporre successivamente a tutte le fasi analitiche previste per i campioni. Altri sistemi di controllo della qualità del campionamento consistono nell'uso di campioni replicati, nell'adottare tutte le precauzioni necessarie per proteggere i campioni in modo da evitare qualsiasi possibile contaminazione, nell'avvinamento regolare dei recipienti.

5. Apparecchiature

Tutto il materiale utilizzato per le operazioni analitiche deve essere condizionato prima dell'uso come descritto al Capitolo 4 precedente.

5.1 Bottiglie di polietilene da 2 L

5.2 Imbuti separatori da 1 L e da 100 mL, in vetro con rubinetto in teflon.

5.3 Matracci tarati in polietilene da 20 mL

6. Reattivi

Tutti i reattivi e l'acqua utilizzata per i lavaggi e la preparazione delle soluzioni di riferimento deveno essere ad elevato grado di purezza.

6.1 *Acido nitrico concentrato (d=1,40)* ad elevato grado di purezza.

6.2 Ammoniaca concentrata (NH_3, d=0,9) ad elevato grado di purezza.

6.3 Cloroformio ($CHCl_3$, d=1,48) ad elevato grado di purezza.

6.4 Soluzione di Ammonio Pirrolidinditiocarbammato (APDC) all'1%

Sciogliere 1 g di APDC in 100 mL di acqua. La soluzione, che ha un aspetto opalescente, è stabile per un tempo brevissimo e va quindi preparata nella quantità necessaria, al momento dell'uso. La soluzione, prima di essere adoperata, va estratta, almeno tre volte, con cloroformio (6.3) per eliminare impurezze metalliche presenti.

6.5 Acido acetico glaciale (CH_3COOH, d=1,05) ad elevato grado di purezza.

6.6 Acetato di ammonio (CH_3COONH_4) ad elevato grado di purezza.

6.7 Soluzione tampone di acido acetico-acetato di ammonio

Sciogliere 250 g di acetato d'ammonio (6.6) in 150 mL di acqua e aggiungere 600 mL di acido acetico (6.5). La soluzione può essere trattata in imbuto separatore da 1 L con 7 mL di APDC e 40 mL di cloroformio (6.3) allo scopo di estrarre e allontanare con la fase organica le impurezze di metalli presenti nei reattivi.

6.8 Soluzione concentrata degli elementi presi in considerazione (1000 mg/L)

Si consiglia di utilizzare soluzioni di riferimento ad elevato grado di purezza disponibili in commercio. Le soluzioni per le aggiunte note si ottengono per diluizioni successive della soluzione concentrata (6.8). Preparare almeno tre soluzioni di riferimento nel campo di applicabilità del metodo.

7. Procedimento

7.1 Preparazione del campione

È opportuno trattare contemporaneamente almeno 3 campioni (per acque marine i campioni non devono essere dissimili in termini di salinità per più del 5‰). Portare un volume pari ad 800 mL di campione a pH 4-5 in imbuto separatore da un litro aggiungendo quantità opportune di ammoniaca (6.2), se il campione è stato preventivamente acidificato. È possibile estrarre volumi di campioni inferiori qualora i livelli di concentrazione degli analiti lo permettano; in tal caso è necessario ridurre proporzionalmente i volumi di reattivi impiegati. Aggiungere, successivamente, la soluzione tampone (6.7), 7 mL di APDC all'1% (6.4) e 20 mL di cloroformio (6.3). Agitare per 2 minuti, quindi lasciare stratificare. Quando le fasi si sono separate, recuperare separatamente lo strato inferiore acquoso (servirà per la preparazione del bianco e del riferimento) e raccogliere interamente lo strato organico in un secondo im-

buto separatore da 100 mL contenente 10 mL di HNO_3 5 M. Ripetere l'estrazione (per ciascun campione) con 20 mL di cloroformio come descritto in precedenza avendo cura di unire lo strato organico a quello precedente nell'imbuto separatore da 100 mL. Quindi procedere all'estrazione di ritorno in ambiente acido agitando per 2 minuti l'imbuto separatore da 100 mL e lasciando stratificare. Quando le fasi si sono separate, recuperare la fase acquose nel matraccio da 20 mL (5.3) e portare a volume con acqua.

7.2 Analisi con il metodo delle aggiunte note

Le 3 fasi acquose rimaste negli imbuti da 1 L servono per la preparazione di bianchi e soluzioni a concentrazioni note.

- Preparazione bianco: aggiungere 20 mL di cloroformio (6.3) alle fasi acquose provenienti dalle precedenti estrazioni (7.1) agitando per 2 minuti. Quando le fasi si sono separate, recuperare gli strati organici ciascuno in un secondo imbuto separatore da 100 mL contenente 10 mL di HNO_3 5 M. Quindi procedere all'estrazione di ritorno in ambiente acido agitando per 2 minuti e lasciando stratificare. Quando le fasi si sono separate, recuperare le fasi acquose nei matracci da 20 mL (5.3) e portare a volume con acqua.
- Preparazione delle soluzioni a concentrazioni note: agli strati acquosi già estratti per preparare i bianchi aggiungere concentrazioni crescenti degli analiti dello stesso ordine di grandezza di quella attesa per il campione. Ripetere quindi la doppia estrazione con cloroformio e l'estrazione di ritorno in ambiente acido (come descritto in precedenza) portando ad un volume finale di 20 mL.
- Determinazione analitica: Misurare quindi, utilizzando la tecnica spettrometrica prescelta, il segnale del campione, delle tre soluzioni di riferimento e dei bianchi dei reattivi, seguendo le indicazioni riportate nel metodo relativo al metallo di interesse, avendo cura di ripetere le misure almeno tre volte. Si considerano accettabili i valori delle repliche che forniscono un coefficiente di variazione inferiore al 10%. Le analisi dei campioni, delle soluzioni di riferimento e del bianco dei reattivi devono essere effettuate nelle stesse condizioni strumentali. La concentrazione totale del metallo presente nelle aliquote non deve superare il valore limite oltre il quale la risposta strumentale non è più lineare.

8. Calcoli

Siano C_1, C_2, C_3, rispettivamente le concentrazioni corrispondenti alla 1ª, 2ª, 3ª aggiunta e A_0, A_1, A_2, A_3, le assorbanze del campione (A_0) e del campione addizionato delle varie aggiunte, sottratte del bianco dei reattivi. Calcolare la retta di regressione che interpola i valori di assorbanza in funzione delle concentrazioni aggiunte, attribuendo al campione incognito di assorbanza A_0 una concentrazione "aggiunta" uguale a zero. La concentrazione incognita riferita al campione sarà data dal valore dall'intercetta sull'asse (x) cambiato di segno. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 10%.

9. Qualità del dato

Su campioni di acqua marina costiera si sono ottenuti coefficienti di variazione dell'ordine del 10-15%. Prove di recupero effettuate sugli stessi campioni hanno fornito rese superiori al 90%.

METODO B - Preconcentrazione mediante resina Chelex-100 per la determinazione di metalli in tracce in acque superficiali

Introduzione

Attualmente la determinazione diretta di metalli ai livelli riscontrabili nelle acque risulta possibile solo per un ristretto numero di elementi, nonostante esistano metodi di analisi caratterizzati da bassi limiti di rivelazione. Di conseguenza, nella maggior parte dei casi, occorre operare uno stadio di preconcentrazione che consenta da un lato un miglioramento della sensibilità di rivelazione e dall'altro un incremento della selettività, eliminando gli effetti negativi di specifici interferenti e/o della matrice stessa. Tra i vari metodi di preconcentrazione disponibili, quelli che utilizzano dei substrati solidi, supportanti o meno specifici reagenti, risultano molto indicati per l'alta selettività e semplicità d'uso.
Negli ultimi anni la ricerca relativa alla preparazione di resine con caratteristiche chelanti, in grado di fissare gli elementi in traccia direttamente dalla soluzione, ha incontrato un crescente interesse. La successiva eluizione delle specie metalliche trattenute dalla resina, consente di ottenere soluzioni analizzabili con tecniche spettroscopiche (ETA-AAS, ICP-OES, ecc.).
I gruppi funzionali chelanti maggiormente studiati sono quelli della dimetilgliossima, dei ditiocarbammati, della 8-idrossochinolina e dell'imminodiacetato. La caratteristica principale di questi gruppi funzionali è data dalla loro capacità di legare selettivamente i metalli di transizione a scapito di altre classi (ad esempio metalli alcalini e/o alcalino-terrosi), rendendo possibile la preconcentrazione contemporanea di più metalli da un unico campione.
La procedura descritta nel seguito prevede l'impiego del gruppo funzionale imminodiacetico (Fig. 1) per la preconcentrazione di metalli in tracce da acque superficiali, dolci e marine.

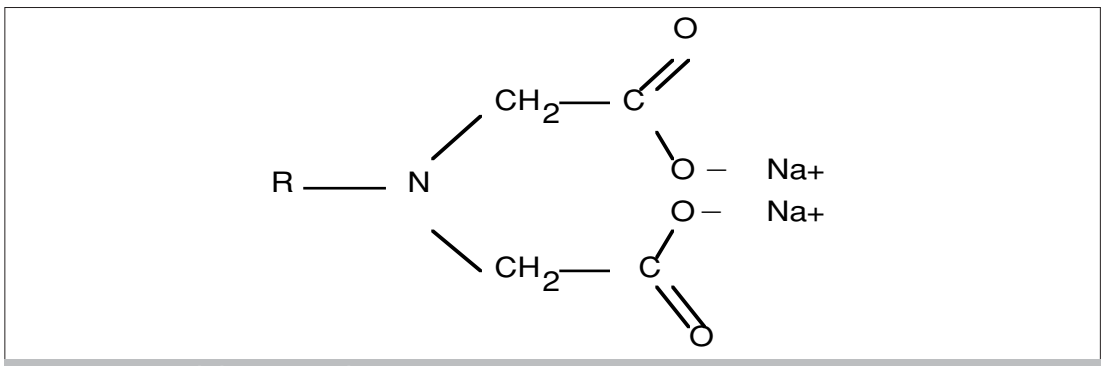


Figura 1: Gruppo chelante imminodiacetico.

Caratteristiche generali

Il gruppo chelante imminodiacetico è solitamente fissato su un supporto organico di tipo polimerico costitutito da stirene e divenilbenzene, e prende il nome commerciale di Chelex-100 (Bio-Rad Lab.), di Dowex A1 (Dow Chemical Co.) e di Amberlite IRC-718 (Rohm & Haas Co.). Solitamente la resina chelante è fornita in forma Na^+, tuttavia mediante opportuno trattamento è possibile convertirla in altre forme chimiche (esempio Ca^{2+}, Mg^{2+}, NH_4^+).
La principale caratteristica di questa resina è l'elevata selettività verso i metalli pesanti rispetto a quelli alcalini ed alcalino-terrosi. La selettività della resina Chelex-100 verso i vari elementi, intesa come la sua affinità per un catione rispetto al catione di riferimento (Zn^{2+}), è la seguente:

$$Hg^{2+} > Cu^{2+} > Ni^{2+} > Pb^{2+} > Zn^{2+} > Co^{2+} > Cd^{2+} > Fe^{2+} > Mn^{2+} >> Ca^{2+} > Mg^{2+} >>> Na^+$$

Occorre tenere presente che l'ordine degli elementi nella serie e la capacità chelante della resina variano in funzione del pH, della forza ionica, della presenza di complessanti o di composti in forma colloidale.

1. Principio del metodo

Il metodo si basa sulla chelazione di ioni metallici presenti nella fase disciolta di campioni acquosi superficiali, mediante resina Chelex-100 in forma NH_4^+.
Successivamente, i metalli trattenuti dalla resina sono eluiti per mezzo di una soluzione acida (HNO_3) di opportuna concentrazione.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile a campioni di acque naturali superficiali (dolci e marine) e consente la rivelazione di bassi livelli di concentrazione (inferiori, in molti casi al µg/L) di Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb e Zn, ottenendo fattori di concentrazione pari a 100. Le determinazioni analitiche dei metalli considerati sono effettuate mediante spettrofotometria di assorbimento atomico con fornetto di grafite (ETA-AAS) o spettrofotometria di emissione atomica in plasma (ICP-OES).

3. Interferenze e cause d'errore

Matrici di acqua dolce e di mare non producono effetti negativi sull'efficienza di recupero dei metalli in tracce; tuttavia, modifiche dei fattori di recupero dei singoli analiti possono essere determinate dalla presenza di specie complessanti e colloidali.

4. Campionamento e conservazione del campione

Prelevare circa 1 L di campione d'acqua, precedentemente filtrato attraverso un filtro a membrana di policarbonato (0,45 µm), e introdurlo in una bottiglia di polietilene da 1 L, precondizionata (vedi Capitolo 5) e prepesata, contenente 6 mL di resina Chelex-100 (forma NH_4^+) e 10 mL di soluzione tampone di acetato di ammonio 1 M. Dopo il prelievo, la bottiglia viene ripesata, registrando il relativo peso su una tabella per il calcolo della concentrazione finale. Conservare a 4°C in attesa dell'estrazione dei metalli trattenuti (da effettuare entro una settimana dal prelievo).

5. Apparecchiature

Tutto il materiale in plastica utilizzato per le operazioni analitiche (bottiglie, imbuti separatori, colonne, matracci) deve essere condizionato prima dell'uso.
Il trattamento del materiale in plastica nuovo avviene mediante un lavaggio preliminare con detersivo liquido, abbondante risciacquo con acqua deionizzata, immersione per una giornata in una soluzione chelante (6.11) e successivo risciacquo con acqua deionizzata. Le bottiglie vanno lavate con acido nitrico diluito (1:10), conservate riempite di acido nitrico diluito (1:10), e, prima dell'uso, risciacquate con acqua deionizzata e poste ad asciugare.
Per le bottiglie e il materiale di plastica già utilizzati è sufficiente un lavaggio con acido nitrico diluito (1:10) e un risciacquo con acqua deionizzata.

5.1 Bottiglie di polietilene da 1 L

5.2 Imbuti separatori da 1 L di polipropilene, con tappo e rubinetto.

5.3 Colonne in polipropilene da 10 mL graduate (0,8x4 cm), dotate di tappo e setto poroso (35 µm) in polietilene.

5.4 Pompa ad acqua

5.5 Matracci in polietilene da 10 mL

5.6 Colonna cromatografica (2,5x20 cm) in vetro e setto poroso (35 µm) in polietilene.

6. Reattivi

I reattivi utilizzati devono essere di grado ultrapuro; l'acqua utilizzata per il risciacquo finale della vetreria e la preparazione delle soluzioni deve essere di elevata purezza (18 µS/cm).

6.1 Resina Chelex-100 (200/400 mesh) in forma Na^+

6.2 Acido nitrico concentrato di grado ultrapuro *(69%, d=1,42)*

6.3 Soluzione diluita di acido nitrico (HNO_3 2,5 M)

Diluire a 500 mL con acqua, 80 mL di acido nitrico concentrato.

6.4 Acido cloridrico concentrato (37%, d=1,18)

6.5 Soluzione di acido cloridrico diluito (HCl 6 M)

Diluire a 1 L con acqua 500 mL di acido cloridrico concentrato.

6.6 Soluzione di ammoniaca concentrata (32%, d=0,88)

6.7 Soluzione di ammoniaca diluita (NH_3 1,7 M)

Diluire a 1 L con acqua 100 mL di ammoniaca concentrata.

6.8 Soluzione di ammoniaca diluita (NH_3 2,5 M)

Diluire a 500 mL con acqua 80 mL di ammoniaca concentrata.

6.9 Acido acetico concentrato (100%, d=1,05)

6.10 Soluzione tampone di acetato di ammonio 1 M purificata (CH_3COONH_4, pH=6,0)

In una bottiglia di polietilene da 1 L condizionata in precedenza (vedi Capitolo 5), porre 400 mL di acqua, 60 mL di acido acetico concentrato. Aggiungere ammoniaca concentrata sino ad ottenere un pH pari a 6,0. Portare a volume (1 L) con acqua, raffreddando la soluzione mediante immersione in un bagno ad acqua e ghiaccio ed agitare per alcuni minuti. Aggiungere infine 6 mL di resina Chelex-100.
Filtrare la soluzione prima dell'uso, su un filtro a membrana in policarbonato (0,45 µm) precedentemente lavato, in sequenza, con: 50 mL di HCl 6 M, 50 mL di acqua, 10 mL di NH_3 1,7 M e 50 mL di acqua.

6.11 Soluzione chelante

In una bottiglia di polietilene da 10 L introdurre EDTA sale bisodico biidrato (50 g), ammonio cloruro (16 g), NH_3 concentrata (100 mL), nero eriocromo T (una "spatolata") e acqua deionizzata per portare a volume a 10 L. La soluzione chelante può essere utilizzata per più lavaggi e ripreparata quando la colorazione passa dal celeste al rosa.

7. Procedimento

7.1 Conversione della resina

Pesare 52 g (d=0,65, circa 80 mL) di Chelex-100 in forma Na^+ e porli con una spatola di plastica nell'apposita colonna cromatografica. Fare passare 250 mL di HNO_3 2,5 M senza lasciare andare a secco la resina (si noterà una diminuzione di volume dovuta alla sostituzione dei gruppi Na^+ con gruppi H^+). Lavare con 100 mL di acqua e successivamente aggiungere, poco per volta, 250 mL di NH_3 2,5 M (si noterà un aumento di volume, dovuto alla sostituzione dei gruppi H^+ con i gruppi NH_4^+). Dopo aver lasciato sedimentare la resina, lavare con 200 mL di acqua, lasciando nella colonna gli ultimi 20 mL. Chiudere con il tappo la colonna e agitare ogni volta per risospendere la resina prima del suo prelievo.
La resina così preparata può essere conservata nella stessa colonna per diversi mesi.

7.2 Preconcentrazione dei metalli disciolti

Porre in agitazione su slitta per 24 ore le bottiglie contenente i campioni, ad una velocità tale da permettere il completo mescolamento. Al termine delle 24 ore procedere all'eluizione dei metalli trattenuti dalla resina chelante. A tale scopo predisporre gli imbuti separatori e le colonne, collegandoli alla pompa ad acqua secondo lo schema riportato in Fig. 2. Trasferire il contenuto delle bottiglie negli imbuti separatori, utilizzando la pompa ad acqua per la completa eliminazione della fase liquida ed il recupero della resina nella colonna.
Il flusso di percolazione va regolato mediante opportuna apertura dei rubinetti ed evitando accuratamente che la resina vada a secco.
Lavare quindi la resina in sequenza con 10 mL di acqua e 25 mL di tampone acetato. Completato il lavaggio, staccare il sistema di aspirazione (pompa e relativi rubinetti) ed eluire con 10 mL di acido nitrico 2,5 M, raccogliendo quantitativamente per gravità l'eluato in matracci prepesati, posti sotto le colonne (Fig. 2). Ripesare i matracci alla fine dell'eluizione.

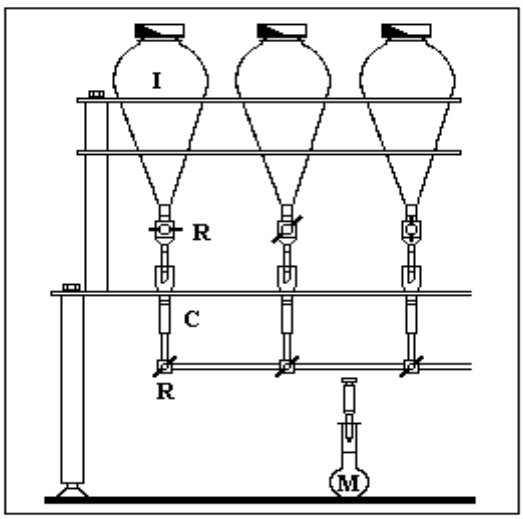


Figura 2: Rappresentazione dell'apparato sperimentale utilizzato per la preconcentrazione e l'eluizione dei metalli da campioni acquosi (I= imbuto separatore, C= colonna; M= matraccio; R= rubinetto).

7.3 Preparazione dei "bianchi" analitici

Per ogni lotto di campioni (n= 4-8), preparare almeno tre "bianchi" analitici preparati versando 6 mL di resina Chelex-100 e 10 mL di tampone acetato in una bottiglia di polietilene da 1 L e sottoponendoli alla procedura prevista per i campioni.

7.4 Determinazione analitica

Procedere alla determinazione analitica dei metalli negli eluati (campioni e relativi "bianchi") mediante spettrofotometria di assorbimento atomico con fornetto di grafite e/o spettrofotometria di emissione atomica in plasma.

8. Calcoli

La concentrazione (C) del metallo presente in fase disciolta nel campione di partenza, espressa in µg/L, si ottiene applicando la seguente formula:

$$C = \frac{p_f \cdot C_c \cdot n - (\Sigma P_{bi} \cdot C_{bi})}{p_i \cdot n \cdot 1{,}074}$$

dove
C_c= concentrazione (µg/L) misurata nell'eluato;
C_{bi}= concentrazione (µg/L) misurata nei "bianchi" analitici;
p_f= peso netto finale (g) dell'eluato;
p_i= peso netto (g) del campione prelevato;
p_{bi}= peso netto (g) dei "bianchi" analitici (bi=b_1, b_2, ecc.);
n = numero dei "bianchi" analitici;
1,074 = densità (g/mL) della soluzione nitrica eluente.

9. Qualità del dato

In Tab. 1 sono riportati i valori percentuali medi di resa di ritenzione (3 replicati) e i valori percentuali di resa di eluizione con HNO_3 2,5 M, ottenuti per alcuni elementi presenti a concentrazione nota, nella fase disciolta, in campioni di acqua di mare con il metodo in discontinuo. A titolo di esempio si riportano i risultati sperimentali riportati in letteratura relativi alla determinazione di alcuni metalli pesanti in un campione di riferimento certificato (NASS-1, NRC Canada) (Tab. 2) e all'efficienza di recupero di alcuni metalli aggiunti in quantità nota a campioni di acqua ultrapura e di acqua di mare con preconcentrazione in discontinuo mediante Chelex-100 (Tab. 3). I recuperi percentuali più elevati sono stati ottenuti con la prima matrice e i valori risultano superiori all'85%.
In Tab. 4 sono riportati i valori dei bianchi analitici e dei limiti di rivelabilità, ottenuti con la procedura di preconcentrazione descritta ed analisi successiva in assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica.

Tabella1: Rese di ritenzione e di eluizione per alcuni elementi presenti in fase disciolta in campioni di acqua di mare

Metallo	Resa di ritenzione (%)	Resa di eluizione (%)
Co	99,7 ± 0,5	92,8
Cd	98,4 ± 0,1	96,1
Fe	97,5 ± 0,3	89,7
Mn	89,8 ± 0,8	92,1
Ni	99,8 ± 0,1	94,9
Pb	99,5 ± 0,2	91,9
Zn	99,8 ± 0,2	91,2

Tabella 2: Valori sperimentali e certificati con materiale di riferimento NASS-1 (N.R.C. Canada)

Metallo	Me trovato (µg/L)	Me certificato (µg/L)
Co	0,0036 ± 0,0007	0,004 ± 0,001
Cu	0,122 ± 0,0180	0,099 ± 0,010
Fe	0,190 ± 0,0600	0,192 ± 0,036
Mn	0,025 ± 0,0130	0,022 ± 0,007
Ni	0,233 ± 0,0140	0,257 ± 0,027
Zn	0,170 ± 0,0680	0,159 ± 0,027

Tabella 3: Recupero (%) degli ioni di metalli (10 µg/L) aggiunti ad acqua di grado ultrapuro e ad acqua di mare mediante preconcentrazione con Chelex-100 (Boniforti et al., 1984)

Matrice	Co (II)	Cu (II)	Fe (III)	Mn (II)	Ni (II)	Zn (II)
Acqua ultrapura	98 ± 3	100 ± 3	95 ± 5	95 ± 5	100 ± 4	100 ± 10
Acqua di mare	92 ± 2,5	88 ± 3	90 ± 15	86 ± 2,5	95 ± 6	100 ± 5

Tabella 4: Valori dei "bianchi" analitici e dei limiti di rilevazione analitici

Metalli	Bianco analitico µg/L	Limite di rivelabilità[a] µg/L
Cd	<0,005	0,005
Co	<0,010	0,010
Cu	<0,020	0,020
Fe	0,21 ± 0,070	0,420
Mn	<0,010	0,010
Ni	<0,020	0,020
Pb	0,04 ± 0,03	0,140
Zn	2,89 ± 3,12	12,300

(a)= $x_b + 3\,\sigma_b$

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA), 3-19/3-22.

BATLEY G.E. & FLORENCE T.M. (1976): "Determination of chemical forms of dissolved cadmium, lead and copper in seawater", *Mar. Chem.*, **4**, 347.

BERMAN S.S., McLAREN J.W. & WILLIE S.N. (1980): " Simultaneous determination of five trace metals in seawater by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry with ultrasonic nebulization", *Anal. Chem.*, **52**, 488-492.

BONIFORTI R., FERRAROLI P., FRIGIERI P., HELTAI D. & QUEIRAZZA G. (1984): "Intercomparison of five methods for the determination of trace metals in sea water". *Anal. Chim. Acta*, **162**, 33-46.

BRULAND K.W., COALE K.H. & MART L. (1985): "Analysis of seawater for dissolved cadmium, copper and lead: an intercomparison of voltammetric and atomic absorption methods", *Mar. Chem.*, **17**, 285-300.

DANIELSON L.G., MAGNUSSON B. & ZHANG K. (1982): "Matrix interference in the determination of trace metals by graphite furnace AAS after Chelex-100 preconcentration", *Atomic Spectroscopy,* **3**, 39-40.

FLORENCE T.M. & BATLEY G.E. (1975): " Removal of trace metals from seawater by a chelating resin", *Talanta*, **22**, 201.

KINGSTON H.M., BARNES I.L., BRADY T.J., RAINS T.C. & CHAMP M.A. (1978): "Separation of eight transition elements in estuarine and seawater with chelating resin and their determination by Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry", *Anal. Chem.*, **50**, (14), 2064-2070.

MIYAZAKY A. & BARNES R.M. (1981): "Complexation of some transition metals, rare earth elements, and thorium with a poly(dithiocarbamate) chelating resin", *Anal. Chem.*, **53**, 299-304.

PAKANLS P., BATLEY G.E. & CAMERON A.J. (1978): "The effect of surfactants on the concentration of heavy metals from natural waters on Chelex-100 resin", *Anal. Chim. Acta*, **99**, 333-342.

PAY S.C., CHEN T.C. & WONG G.T.F. (1990): "Maleic acid/ammonium hydroxide buffer system for preconcentration of trace metals from seawater", *Anal. Chem.*, **62**, 774-777.

RILEY J.P. & TAYLOR D. (1968): "Chelating resins for the concentration of trace elements from sea water and their analytical use in conjunction with atomic absorption spectrophotometry", *Anal. Chim. Acta*, **40**, 479.

STURGEON R.E., BERMAN S.S., DESAULNIERS J.A.H., MYKYTIUK A.P., McLAREN J.W. & RUSSELL D.S. (1980): "Preconcentration of trace metals from seawater for determination by graphite furnace atomic absorption spectrometry", *Talanta*, **27**, 85-94.

STURGEON R.E., BERMAN S.S., WILLIE S.N. & DESAULNIERS J.A.H. (1981): "Preconcentration of trace elements from seawater with silica-immobilized 8-hydroxyquinoline", *Anal. Chem.*, **53**, 2337-2340.

3050. Alluminio

L'alluminio, con un contenuto di circa l'8% nella crosta terrestre rappresenta il metallo più abbondante sulla Terra e il terzo elemento della litosfera dopo l'Ossigeno e il Silicio. Il minerale più importante per l'estrazione del metallo è la bauxite ($Al_2O_3 \cdot 2H_2O$). L'alluminio, allo stato metallico, trova notevole impiego nell'edilizia, nell'industria automobilistica, nell'industria alimentare e, per la sua buona conducibilità elettrica, in elettrotecnica. I sali di alluminio trovano applicazione nella depurazione delle acque, nella preparazione di prodotti cosmetici e farmaceutici.
Nelle acque dolci superficiali è generalmente presente associato a colloidi organici, e la concentrazione indicata come valore di riferimento per acque fluviali è di 50 µg/L. Nell'acqua di mare è presente sia associato a colloidi che come idrossido $Al(OH)_4^-$ e la sua concentrazione di riferimento è di 0,5 µg/L in acque oceaniche. Concentrazioni disciolte leggermente più alte (1,5-3,5 µg/L) sono state riportate per il mar Mediterraneo.
Criteri di qualità proposti da vari enti internazionali (ente di protezione ambientale canadese, US EPA, WRC-UK) forniscono per l'alluminio solubile un intervallo di valori (5-100 µg/L) per la protezione della vita acquatica e un valore di 200 µg/L per le acque ad uso potabile. Il D.Lgs. 152/99 in materia di tutela delle acque dall'inquinamento prevede un criterio di qualità di 200 µg/L per le acque sotterranee.

METODO A - Determinazione per spettrometria di assorbimento atomico con atomizzazione in fiamma (F-AAS)

1. Principio del metodo

L'alluminio viene determinato per aspirazione diretta del campione nella fiamma (protossido di azoto-acetilene) di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico. Dalla misura del segnale di assorbanza a 309,3 nm si ricava la concentrazione mediante confronto con una curva di taratura ottenuta con soluzioni a concentrazioni note di analita, comprese nel campo di indagine analitico.

2. Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione dell'alluminio in campioni di acque naturali e di scarico nell'intervallo di concentrazione da 1,0 a 50 mg/L. Per concentrazioni superiori a 50 mg/L è possibile rientrare nell'intervallo indicato ricorrendo alla diluizione del campione oppure facendo ricorso ad una lunghezza d'onda meno sensibile, prendendo come riferimento quelle generalmente consigliate dal manuale d'uso fornito a corredo dell'apparecchiatura.
Effettuando 10 determinazioni su uno stesso campione avente un contenuto di alluminio pari a 1,0 mg/L, alternate con una misura del bianco, si è potuto calcolare un limite di rivelabilità, espresso come tre volte lo scarto tipo, di 0,2 mg/L.

3. Interferenze e cause di errore

L'utilizzo del correttore di fondo consente di minimizzare gli assorbimenti aspecifici eventual-

mente presenti. Nel caso in cui si debba determinare l'analita in una matrice sconosciuta o scarsamente caratterizzata è consigliabile ricorrere al metodo delle aggiunte note. Tale metodo permette di minimizzare le interferenze di matrice di tipo fisico e/o chimico (variazioni di densità, viscosità, tensione superficiale) eventualmente presenti.
L'aggiunta di sali di lantanio allo 0,1% consente di eliminare le interferenze da ionizzazione.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". Si consiglia di conservare i campioni in bottiglie di polipropilene, o altro materiale caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli, precedentemente trattate con HNO_3 1 M per una notte e successivamente neutralizzate con acqua ad elevato grado di purezza. Per determinare soltanto l'alluminio disciolto, il campione viene filtrato dopo il prelievo su membrana da 0,45 µm (acetato di cellulosa o policarbonato) e acidificato fino a pH<2 con HNO_3 (6.1). L'analisi deve essere effettuata prima possibile e comunque il campione acidificato rimane stabile per almeno una settimana dal prelievo. Per la determinazione quantitativa dell'alluminio totale si rimanda alle Sezioni 3000 e 3010.

5. Apparecchiature

5.1 Spettrofotometro di assorbimento atomico, corredato di bruciatore standard per protossido d'azoto-acetilene e di dispositivo per la correzione degli assorbimenti aspecifici.

5.2 Lampada a catodo cavo o altra sorgente luminosa capace di emettere lo spettro dell'elemento in esame.

6. Reattivi

Tutti i reattivi e l'acqua utilizzata per i lavaggi e la preparazione delle soluzioni di riferimento devono essere ad elevato grado di purezza.

6.1 Acido nitrico concentrato (d=1,40)

6.2 *Soluzione di lantanio (1% La)*

6.3 Soluzione concentrata di alluminio (1000 mg/L)

Si consiglia di utilizzare soluzioni di riferimento ad elevato grado di purezza disponibili in commercio.

6.4 Soluzione diluita di alluminio (100 mg/L)

Trasferire 10 mL della soluzione (6.3) in pallone tarato da 100 mL, aggiungere 1 mL di HNO_3 (6.1) e portare a volume con acqua ad elevato grado di purezza. Questa soluzione è stabile per almeno un mese se conservata a 4°C in un contenitore caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli (polietilene o policarbonato) e opportunamente chiuso in modo da evitare sia l'evaporazione del solvente che eventuali contaminazioni.

7. Procedimento

7.1 Ottimizzazione dei parametri strumentali

Per migliorare le prestazioni analitiche dell'apparecchiatura e per minimizzare eventuali interferenze procedere all'ottimizzazione dei parametri strumentali seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento o in altri protocolli standardizzati. In Tab. 1 sono elencate, a titolo di esempio, le condizioni operative tipiche per l'esecuzione delle analisi.

Tabella 1: Condizioni operative strumentali

Lunghezza d'onda (nm)	309,3
Fenditura (nm)	0,7
Correzione del fondo	attivata
Fiamma	protossido di azoto-acetilene
Intensità di corrente della lampada (mA)	come da specifica

7.2 Analisi

7.2.1 Determinazione diretta

Dopo aver impostato i parametri strumentali come descritto al Paragrafo 7.1, costruire la curva di taratura utilizzando almeno tre soluzioni di riferimento preparate diluendo opportunamente la soluzione diluita (6.4), in modo tale da coprire l'intero campo di indagine analitico, e il bianco dei reattivi. Ripetere la misura di ogni soluzione di riferimento compreso il bianco almeno tre volte.
Quindi, eseguire l'analisi dei campioni effettuando almeno tre letture per ogni soluzione da analizzare; si considerano accettabili i valori che forniscono un coefficiente di variazione inferiore al 5%. Le analisi dei campioni, delle soluzioni di riferimento e del bianco dei reattivi devono essere effettuate nelle stesse condizioni strumentali. Se la risposta del campione incognito analizzato cade al di fuori dell'intervallo di linearità diluire opportunamente il campione per riportarlo nel campo di linearità. Qualora risulti necessaria una diluizione del campione talmente elevata da esaltare gli errori connessi alla suddetta operazione è preferibile ripetere sia la taratura che l'analisi ricorrendo ad un'altra riga analitica meno sensibile.
Nel caso in cui sia richiesta l'analisi di un numero notevole di campioni si consiglia di controllare la taratura inserendo ogni cinque campioni una soluzione di controllo utilizzata per la taratura e verificando che il valore di quest'ultima risulti entro il ±5% del valore atteso.

7.2.2 Metodo delle aggiunte note

Il campione viene suddiviso in quattro aliquote, di cui una rimane tal quale, mentre alle altre si aggiungono concentrazioni crescenti dell'analita dello stesso ordine di grandezza di quella attesa per il campione. Misurare l'assorbanza delle quattro soluzioni e del bianco dei reattivi seguendo le indicazioni riportate al Paragrafo 7.1, avendo cura di ripetere le misure almeno tre volte. La concentrazione totale di alluminio presente nelle aliquote deve comunque essere inferiore al valore limite oltre il quale la risposta strumentale non è più lineare.

8. Calcoli

8.1 Determinazione diretta

La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le concentrazioni (mg/L) delle soluzioni di riferimento in ascissa e le assorbanze corrispondenti, corrette del bianco, in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%. Calcolare quindi la concentrazione dell'alluminio nel campione utilizzando l'equazione ottenuta dalla regressione lineare, tenendo conto dell'eventuale diluizione effettuata.

8.2 Metodo delle aggiunte

Siano C_1, C_2, C_3, rispettivamente le concentrazioni corrispondenti alla 1ª, 2ª, 3ª aggiunta e A_0, A_1, A_2, A_3, le assorbanze del campione (A_0) e del campione addizionato delle varie aggiunte, sottratte del bianco dei reattivi. Calcolare la retta di regressione che interpola i valori di assorbanza in funzione delle concentrazioni aggiunte, attribuendo al campione incognito di assorbanza A_0 una concentrazione "aggiunta" uguale a zero. La concentrazione incognita riferita al campione sarà data dal valore dell'intercetta sull'asse (x) cambiato di segno. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%.

9. Qualità del dato

Prove effettuate in quintuplicato da tre laboratori su campioni di acque di scarico, dopo aggiunta di quantità note di alluminio in modo da ottenere una concentrazione di 5,0 mg/L, hanno fornito valori del coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio) · 100, compresi tra l'1,9% ed il 4,8% ed un'accuratezza compresa tra l'1% ed il 5%.
Non essendo stati utilizzati materiali di riferimento, l'accuratezza va intesa come grado di accordo tra il risultato della misurazione e il valore di riferimento accettato.
Per acque di scarico, dopo aggiunta di quantità note di alluminio tali da realizzare una concentrazione finale di 4,5 mg/L, lo Standard Methods riporta una riproducibilità del 4,2% ed un'accuratezza dell'8,4%.

Nota: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico". Caratterizzato il materiale di riferimento non certificato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, è possibile verificare gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.*

METODO B – Determinazione per spettrometria di assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica (ETA-AAS)

1. Principio del metodo

L'alluminio viene determinato per iniezione diretta del campione nel fornetto di grafite di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico. Dalla misura del segnale di assorbanza a 309,3 nm si ricava la concentrazione mediante confronto con una curva di taratura ottenuta con soluzioni a concentrazioni note di analita, comprese nel campo di indagine analitico.

2. Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione dell'alluminio in campioni di acque naturali e di scarico nell'intervallo di concentrazione da 1,0 a 40,0 µg/L. Per concentrazioni superiori a 40 µg/L è possibile rientrare nell'intervallo indicato ricorrendo alla diluizione del campione.
Effettuando 10 determinazioni su uno stesso campione avente un contenuto di alluminio pari a 1,0 µg/L, alternate con una misura del bianco, si è potuto calcolare un limite di rivelabilità, espresso come tre volte lo scarto tipo, di 0,2 µg/L (volume iniettato: 25 µL di campione e 25 µL di modificante). Tale limite dipende dalla matrice e dalle condizioni strumentali ap-

plicate; può essere leggermente migliorato aumentando il volume di campione iniettato. Tuttavia applicando queste modalità vengono esaltati gli effetti delle specie interferenti.

3. Interferenze e cause di errore

L'utilizzo del correttore di fondo consente di minimizzare gli assorbimenti aspecifici eventualmente presenti. Nel caso in cui si debba determinare l'analita in una matrice sconosciuta o scarsamente caratterizzata è consigliabile ricorrere al metodo delle aggiunte note. Tale metodo permette di minimizzare le interferenze di tipo fisico e/o chimico eventualmente presenti. Il ricorso ad un idoneo modificatore consente di rendere la matrice più volatile o di formare composti più stabili con l'elemento in esame; mediante un opportuno ciclo elettrotermico è possibile allontanare la matrice senza perdere l'analita di interesse.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". In particolare, considerando le basse concentrazioni da determinare, si consiglia di conservare i campioni in bottiglie di polipropilene o altro materiale caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli, precedentemente trattate con HNO_3 1 M per una notte e successivamente neutralizzate con acqua ad elevato grado di purezza. Per determinare soltanto l'alluminio disciolto, il campione viene filtrato dopo il prelievo su membrana da 0,45 µm (acetato di cellulosa o policarbonato) e acidificato fino a pH<2 con HNO_3 (6.1). L'analisi deve essere effettuata prima possibile e comunque il campione acidificato rimane stabile per almeno una settimana dal prelievo. Per la determinazione quantitativa dell'alluminio totale si rimanda alle Sezioni 3000 e 3010.
È buona norma considerare sempre l'opportunità di predisporre un "bianco di campo", ottenuto semplicemente mediante lo stoccaggio di un'aliquota di acqua ultrapura in un recipiente identico a quello dei prelievi, da sottoporre successivamente a tutte le fasi analitiche previste per i campioni. Altri sistemi di controllo della qualità del campionamento consistono nell'uso di campioni replicati, nell'attivazione di precauzioni per proteggere i campioni in modo da evitare qualsiasi possibile contaminazione, nell'avvinamento regolare dei recipienti.

5. Apparecchiature

5.1 Spettrofotometro di assorbimento atomico, corredato di fornetto di grafite e di dispositivo per la correzione degli assorbimenti aspecifici.

5.2 Lampada a catodo cavo o altra sorgente luminosa capace di emettere lo spettro dell'elemento in esame.

5.3 Autocampionatore oppure micropipette tarate per il dosaggio di pochi µL.

5.4 Dispositivo per la registrazione dell'assorbanza, adatto ad evidenziare la forma del picco.

5.5 Dispositivo che fornisce argon ultrapuro

6. Reattivi

Tutti i reattivi e l'acqua utilizzata per i lavaggi e la preparazione delle soluzioni di riferimento devono essere ad elevato grado di purezza.

6.1 Acido nitrico concentrato (d=1,40)

6.2 Soluzione concentrata di alluminio (1000 mg/L)

Si consiglia di utilizzare soluzioni di riferimento ad elevato grado di purezza disponibili in commercio.

6.3 Soluzione diluita di alluminio (2,0 mg/L)

Trasferire 200 µL della soluzione (6.2) in pallone tarato da 100 mL, aggiungere 1 mL di HNO_3 (6.1) e portare a volume con acqua ad elevato grado di purezza. Questa soluzione è stabile per almeno un mese se conservata a 4°C in un contenitore caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli (polietilene o policarbonato) e opportunamente chiuso in modo da evitare sia l'evaporazione del solvente che eventuali contaminazioni.

6.4 Modificatore di matrice $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$

Sciogliere 0,3455 g di $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ di grado ultrapuro in acqua deionizzata e portare a volume in matraccio tarato da 100 mL in polietilene. È possibile utilizzare anche altri modificatori seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento.

7. Procedimento

7.1 Ottimizzazione dei parametri strumentali

Per migliorare le prestazioni analitiche dell'apparecchiatura e per minimizzare eventuali interferenze, procedere all'ottimizzazione dei parametri strumentali seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento o in altri protocolli standardizzati. In Tabb. 1-2 sono elencate, a titolo di esempio, le condizioni operative tipiche per l'esecuzione delle analisi.

Tabella 1: Condizioni operative strumentali

Lunghezza d'onda (nm)	309,3
Fenditura (nm)	0,7
Rilevazione del segnale	altezza o area del picco
Correzione del fondo	attivata
Tubo	pirolitico
Intensità di corrente	come da specifica
Volume del campione (µL)	25
Volume del modificante di matrice (µL)	25

Tabella 2: Programma termico

	T°C	RT	HT	G	R
Essiccamento	120	20	20	300	
Incenerimento	1500	40	20	300	
Atomizzazione	2600	0	5	0	*
Pulizia	2700	1	5	300	

RT = tempo in secondi della rampa di temperatura
HT = tempo in secondi di permanenza alla temperatura impostata (isoterma)
T°C = temperatura impostata in °C
G = flusso del gas di lavaggio (argon ultrapuro) in mL/minuto
R = attivazione della lettura in atomizzazione.

Il ciclo elettrotermico riportato è valido nel caso in cui si utilizzi un tubo di grafite pirolitica; in tutti gli altri casi andrà ottimizzato, prendendo come riferimento quello generalmente consigliato dal manuale d'uso fornito a corredo dell'apparecchiatura.

7.2 Analisi

7.2.1 Determinazione diretta

Dopo aver impostato i parametri strumentali come descritto al Paragrafo 7.1, costruire la curva di taratura utilizzando almeno tre soluzioni di riferimento scelte nel campo di indagine analitico, preparate diluendo opportunamente la soluzione (6.3), e il bianco dei reattivi. Ripetere la misura di ogni soluzione di riferimento compreso il bianco almeno tre volte.
Quindi, eseguire l'analisi dei campioni effettuando almeno tre letture per ogni soluzione da analizzare; si considerano accettabili i valori che forniscono un coefficiente di variazione inferiore al 10%. Le analisi dei campioni, delle soluzioni di riferimento e del bianco dei reattivi devono essere effettuate nelle stesse condizioni strumentali. Se la risposta del campione incognito analizzato cade al di fuori dell'intervallo di linearità, diluire opportunamente il campione per riportarlo nel campo di linearità. Qualora risulti necessaria una diluizione del campione talmente elevata da esaltare gli errori connessi alla suddetta operazione è preferibile ripetere sia la taratura che l'analisi riducendo la quantità di campione iniettato nel fornetto di grafite oppure aumentando il flusso di gas di lavaggio in atomizzazione.
Nel caso in cui sia richiesta l'analisi di un numero notevole di campioni si consiglia di controllare la taratura inserendo ogni cinque campioni una soluzione di controllo utilizzata per la taratura e verificando che il valore di quest'ultima risulti entro il ±5% del valore atteso.

7.2.2 Metodo delle aggiunte note

Il campione viene suddiviso in quattro aliquote, di cui una rimane tal quale, mentre alle altre si aggiungono concentrazioni crescenti dell'analita dello stesso ordine di grandezza di quella attesa per il campione. Misurare l'assorbanza delle quattro soluzioni e del bianco dei reattivi seguendo le indicazioni riportate al Paragrafo 7.1, avendo cura di ripetere le misure almeno tre volte. La concentrazione totale dell'alluminio presente nelle aliquote non deve superare il valore limite oltre il quale la risposta strumentale non è più lineare.

8. Calcoli

8.1 Determinazione diretta

La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le concentrazioni (μg/L) delle soluzioni di riferimento in ascissa e le assorbanze corrispondenti, corrette del bianco, in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%. Calcolare quindi la concentrazione dell'alluminio nel campione utilizzando l'equazione ottenuta dalla regressione lineare, tenendo conto dell'eventuale diluizione effettuata.

8.2 Metodo delle aggiunte

Siano C_1, C_2, C_3, rispettivamente le concentrazioni corrispondenti alla 1ª, 2ª, 3ª aggiunta e A_0, A_1, A_2, A_3, le assorbanze del campione (A_0) e del campione addizionato delle varie aggiunte, sottratte del bianco dei reattivi. Calcolare la retta di regressione che interpola i valori di assorbanza in funzione delle concentrazioni aggiunte, attribuendo al campione incognito di assorbanza A_0 una concentrazione "aggiunta" uguale a zero. La concentrazione incognita riferita al campione sarà data dal valore dell'intercetta sull'asse (x) cambiato di segno. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%.

9. Qualità del dato

Prove effettuate in quintuplicato da quattro laboratori su soluzioni sintetiche in acqua deionizzata hanno fornito i seguenti risultati:

Concentrazione attesa (µg/L)	5,0	20,0
Concentrazione trovata (µg/L)*	6,9 ± 3,6	14,8 ± 6,0
CV (%) intralaboratorio	18,0	4,7
CV (%) interlaboratorio	52,2	40,5
Accuratezza (%)**	38,0	26,0

** valor medio ± scarto tipo*
CV (%) = coefficiente di variazione; CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100
*** Non essendo stati utilizzati materiali di riferimento, l'accuratezza va intesa come grado di accordo tra il risultato della misurazione e il valore di riferimento accettato.*

Va tenuto presente che la precisione e accuratezza di un metodo generalmente peggiorano all'aumentare della complessità della matrice. L'EPA in uno studio condotto tra dieci laboratori riporta per campioni di acque di scarico, ad una concentrazione di 20,5 µg/L, una precisione del singolo analista pari al 24%, una precisione totale del 21% ed un'accuratezza del 97%.

Nota: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico". Caratterizzato il materiale di riferimento non certificato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, è possibile verificare gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.*

METODO C – Determinazione spettrofotometrica con eriocromocianina R

1. Principio del metodo

Il metodo è basato sulla reazione dell'alluminio con il colorante eriocromocianina R. In soluzione acquosa a pH = 6 il complesso che si forma presenta un massimo di assorbimento alla lunghezza d'onda di 535 nm. L'assorbanza della soluzione è proporzionale alla concentrazione di alluminio.

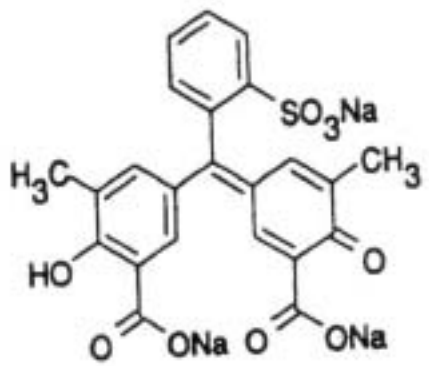


Figura 1: Formula di struttura dell'eriocromocianina R.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ad acque naturali e di scarico nell'intervallo di concentrazione 0,02 - 0,3 mg/L. Concentrazioni più elevate possono essere determinate mediante diluizione del campione.

3. Interferenze e cause di errore

Errori in difetto possono essere causati dalla presenza di fluoruri e polifosfati. Nel primo caso l'errore può essere evitato tenendo conto nel calcolo del peso dell'interferenza mostrato in Fig. 2, o mediante l'aggiunta alle soluzioni di riferimento della stessa quantità di fluoruro determinata preliminarmente sui campioni.
Nel secondo caso il metodo prevede un procedimento per evitare l'interferenza di fosfati complessi (7.2.2).
L'interferenza dovuta all'alcalinità è evitabile acidificando il campione fino al viraggio del metilarancio.
L'interferenza di ferro e manganese può essere eliminata aggiungendo una soluzione di acido ascorbico.

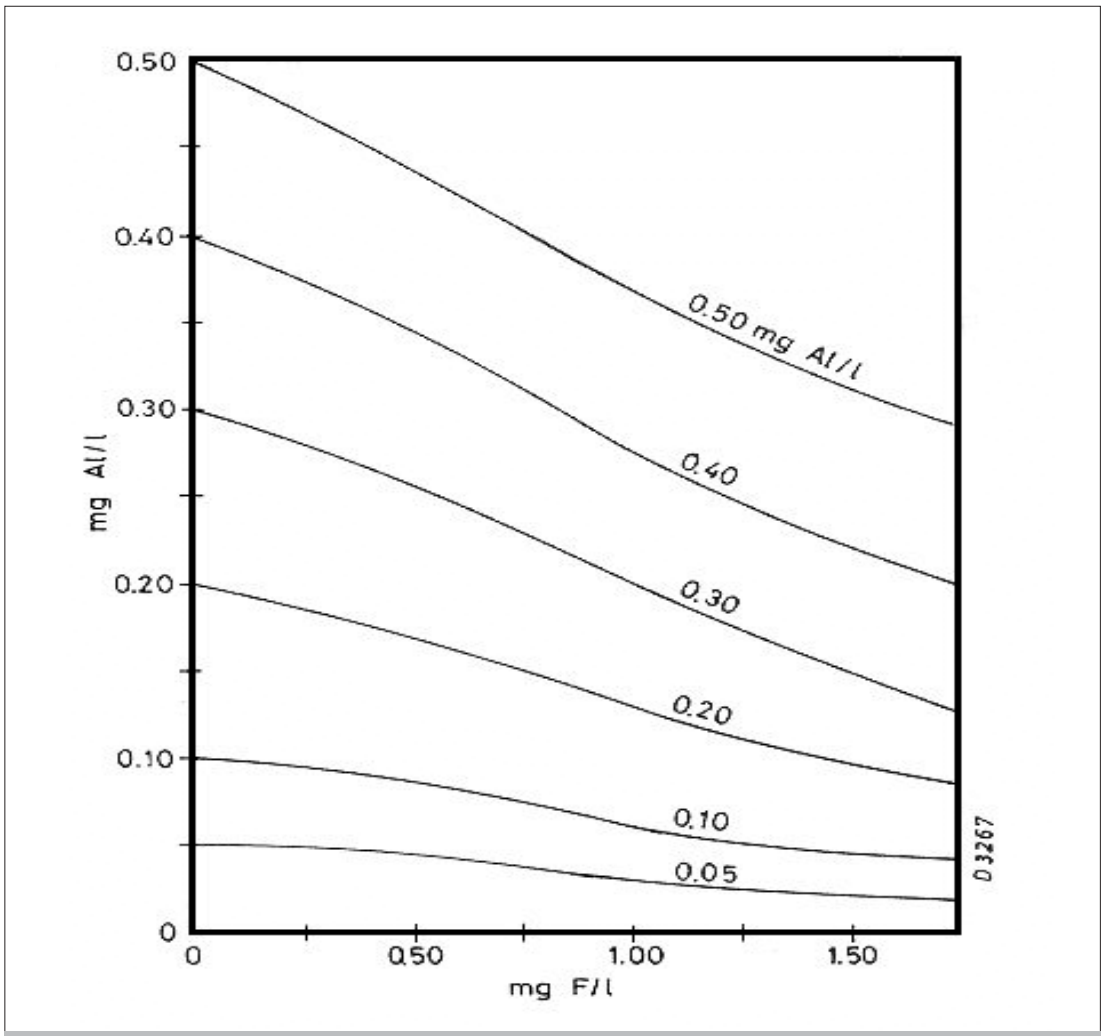


Figura 2: Curve di correzione per la stima dell'alluminio in presenza di fluoruri. Trovare il punto di intersezione tra i valori di concentrazione misurati di alluminio e fluoruri. Se il punto non cade direttamente in una delle curve, interpolare tra le due curve più prossime per trovare il "valore vero".

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione debbono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".
In particolare i campioni debbono essere raccolti in recipienti di polietilene tenuti in bagno acido e poi sciacquati con acqua; le determinazioni debbono essere effettuate prima possibile. Se si deve procedere alla determinazione del solo alluminio solubile i campioni debbono essere filtrati attraverso una membrana avente una porosità di 0,45 µm.
Evitare materiali come carta, cotone o lana di vetro perché con il loro impiego si verifica la rimozione della maggior parte dell'alluminio solubile.

5. Apparecchiature

5.1 Normale attrezzatura di laboratorio

5.2 Spettrofotometro per misure alla lunghezza d'onda di 535 nm con celle aventi un cammino ottico di 1 cm o superiori.

5.3 Vetreria

Per evitare errori dovuti a materiale adsorbito sul vetro tutta la vetreria deve essere trattata con acido cloridrico 1+1 e sciacquata con acqua fino alla eliminazione completa dell'acido.

6. Reattivi

I reattivi e l'acqua debbono essere privi di alluminio.

6.1 Soluzione concentrata di alluminio (1000 mg/L)

Si consiglia di utilizzare soluzioni di riferimento ad elevato grado di purezza disponibili in commercio. In alternativa, sciogliere 8,792 g di solfato di alluminio e potassio, $AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ in acqua deionizzata e portare a volume a 500 mL con acqua.

6.2 Soluzione diluita di alluminio (5 mg/L)

Diluire 5 mL della soluzione concentrata di alluminio (6.1) a 1000 mL con acqua. Questa soluzione deve essere preparata al momento dell'uso.

6.3 Soluzioni di acido solforico (H_2SO_4) 3 M e 0,02 N

6.4 Soluzione di acido ascorbico

Sciogliere 0,1 g di acido ascorbico in acqua e portare a volume con acqua in matraccio tarato da 100 mL. Questa soluzione è stabile per un giorno.

6.5 Tampone acido acetico-acetato

Sciogliere 36 g di acetato di sodio, $NaC_2H_3O_2 \cdot 3H_2O$ in acqua, aggiungere 40 mL di soluzione di acido acetico 1 M e diluire a 1 litro con acqua.

6.6 Soluzione concentrata di colorante

Sciogliere 300 mg di eriocromocianina R ($C_{23}H_{15}Na_3O_9S$) in circa 50 mL di acqua. Portare il pH da circa 9 a 2,9 con acido acetico 1+1 (sono necessari circa 3 mL) e diluire a 100 mL con acqua.

6 7 Soluzione diluita di colorante

Diluire 10 mL della soluzione concentrata di colorante a 100 mL con acqua. Questa soluzione è stabile 6 mesi.

6.8 Soluzione di indicatore metilarancio

6.9 Soluzione di EDTA 0,01 M

Sciogliere 3,7 g di sale disodico dell'acido etilendiamminotetraacetico (EDTA) in acqua e diluire a 1 litro con acqua.

6.10 Soluzione di idrossido di sodio NaOH 1 M

Sciogliere 4 g di idrossido di sodio in acqua e diluire a 100 mL con acqua.

6.11 Soluzione di idrossido di sodio NaOH 0,1 M

Prelevare 5 mL di questa soluzione e diluire a 50 mL con acqua.

7. Procedimento

7.1 Taratura

Preparare in matraccio tarato da 50 mL un bianco dei reattivi privo di alluminio e una serie di soluzioni di riferimento contenenti, ad esempio, 1 µg, 2 µg, 3 µg, 5 µg e 7 µg di alluminio prelevando 0,2 mL; 0,4 mL; 0,6 mL; 1,0 mL e 1,4 mL della soluzione diluita (6.2). Aggiungere acqua fino a un volume totale di circa 25 mL.
Aggiungere a ciascuna soluzione 1 mL di H_2SO_4 0,02 N, 1 mL di soluzione di acido ascorbico e 10 mL di soluzione tampone. Mescolare dopo ogni aggiunta.
Con una pipetta graduata aggiungere 5 mL di soluzione diluita di eriocromocianina R e mescolare. Portare a volume con acqua, mescolare e attendere da 5 a 10 minuti (dopo 15 minuti il colore comincia a scomparire gradualmente). Misurare quindi l'assorbanza della soluzione alla lunghezza d'onda di 535 nm contro il bianco dei reattivi.
Costruire la curva di taratura riportando i µg di alluminio/50 mL di volume finale in ascissa e i valori di assorbanza in ordinata.

7.2 Determinazione

7.2.1 Determinazione in assenza di fluoruri e fosfati complessi

Porre 25 mL di campione (o una aliquota diluita a 25 mL) in un recipiente di porcellana, aggiungere qualche goccia di soluzione di metilarancio e titolare con soluzione di acido solforico 0,02 N fino al viraggio al rosa. Registrare la lettura e scartare il campione.
Trasferire due aliquote da 25 mL di uno stesso campione in matracci tarati da 50 mL, aggiungere a temperatura ambiente lo stesso volume di soluzione di acido solforico 0,02 N utilizzato per la titolazione precedente più 1 mL in eccesso. Ad una di queste aliquote aggiungere 1 mL di soluzione di EDTA allo scopo di complessare l'alluminio presente e compensare colore e torbidità nella misura spettrofotometrica.
Aggiungere ad ambedue le aliquote 1 mL di soluzione di acido ascorbico, 10 mL di soluzione tampone, 5 mL di soluzione di colorante mescolando dopo ogni aggiunta.
Portare a volume con acqua, mescolare e, dopo 5-10 minuti, misurare l'assorbanza del campione contro il bianco EDTA, come descritto al punto 7.1. Determinare la concentrazione di alluminio tramite la curva di taratura.

7.2.2 Determinazione in presenza di fosfati

Aggiungere 1,7 mL di soluzione di acido solforico 3 M a 100 mL di campione in una beuta da 200 mL. Scaldare almeno 90 minuti mantenendo la temperatura della soluzione appena sotto il punto di ebollizione fino ad avere un volume di circa 25 mL (in caso di volume minore aggiungere acqua).
Dopo aver raffreddato portare a pH 4,4 (±0,1) con NaOH 1 M (6.10) e 0,1 M (6.11). Diluire a 100 mL con acqua, mescolare e utilizzare un'aliquota di 25 mL per la determinazione dell'alluminio (come in 7.1). Contemporaneamente effettuare una prova in bianco sottoponendo allo stesso trattamento 100 mL di acqua.
L'ortofosfato derivante dalla digestione acida, non interferisce fino a concentrazioni pari a 5 mg/L. Ove si conosca la concentrazione del fosfato si può operare, tenuto conto dell'elevata sensibilità del metodo su soluzioni diluite del campione in modo da portare il valore dell'interferente al di sotto del valore limite.
Quando la concentrazione del fosfato non è nota, al fine di verificare l'assenza della interferenza si consiglia di operare sul campione tal quale e su porzioni opportunamente diluite verificando se le risposte sono inversamente proporzionali alle diluizioni effettuate.

7.2.3 Determinazione in presenza di fluoruri

Misurare la concentrazione dei fluoruri impiegando il metodo descritto in questo manuale (Sezione 4100); utilizzare per la determinazione dell'alluminio la serie di curve della Fig. 2 oppure, in alternativa, riferirsi a soluzioni di riferimento, preparate in modo tale da avere la stessa concentrazione di fluoruro determinata sui campioni.

8. Calcoli

$$A = \frac{m}{V}$$

dove:
C = concentrazione ($\mu g \cdot L^{-1}$) di Al;
a = quantità (μg) di alluminio nei 50 mL di volume finale;
V = volume (mL) di campione sottoposto ad analisi.

9. Qualità del dato

Prove di precisione effettuate su una serie di 5 campioni a concentrazione variabile di Al hanno fornito un coefficiente di variazione, [CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100], compreso tra il 2% e il 18%, con valori più alti per i campioni aventi concentrazione più basse, vicine al limite inferiore del campo di applicazione.
Per quanto riguarda l'accuratezza, su campioni cui sono state fatte aggiunte per ottenere 0,2 mg/L di alluminio sono stati ottenuti recuperi compresi tra il 95% e il 105%.
Non essendo stati utilizzati materiali di riferimento, l'accuratezza va intesa come grado di accordo tra il risultato della misurazione e il valore di riferimento accettato.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA), 3-24 / 3-31.

IRSA (1986 a): "I metalli nelle acque: origine, distribuzione, metodi di rimozione", Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **71**, 21 - 22.

IRSA (1986 b): "Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **75**, 263-278.

SHULL K.E. & GUTHAN G.R. (1967): "Rapid modifical Eriochromo cyanin R method for determination of aluminium in water", *J. Amer. Water.Works Ass.*, **59**, 1456.

UNICHIM (1995): "*Linee Guida per la taratura della strumentazione analitica - Spettrometri di assorbimento atomico a fiamma (FAAS)*", Manuale 177/1, Milano.

UNICHIM (1996): "*Linee Guida per la taratura della strumentazione analitica – Spettrometri di assorbimento atomico ad atomizzazione elettrotermica (EAAS)*", Manuale 177/2, Milano.

3060. Antimonio

La concentrazione di antimonio nella crosta terrestre è di circa 0,2 ppm. In natura si trova allo stato di solfuro Sb_2S_3, di triossido Sb_2O_3, di tetrossido Sb_2O_4 e di tioantimonito Ag_3SbS_3. Le principali fonti antropogeniche dell'elemento sono l'attività mineraria, metallurgica e l'uso di carbone quale combustibile. Tra gli impieghi più significativi si segnala la produzione di leghe metalliche bassofondenti e considerevolmente dure. Viene impiegato, ad esempio, insieme a stagno e piombo in leghe per caratteri da stampa. È inoltre probabile che l'antimonio vada a sostituire, alla luce dei limiti più restrittivi imposti per il piombo dalla nuova direttiva europea concernente la qualità delle acque potabili, il piombo nelle leghe di saldatura utilizzate nelle reti acquedottistiche.
L'antimonio può essere presente in natura in diversi stati di ossidazione (+5), (+3), (0) e (-3) ma solo gli stati trivalente e pentavalente hanno importanza pratica. L'antimonio ha scarsa tendenza ad essere adsorbito sul particellato presente nelle acque. Essendo un elemento poco diffuso e poco indagato si hanno informazioni limitate sui livelli naturali dell'elemento nelle acque. Viene indicato come valore naturale di riferimento 1 µg/L per le acque fluviali e 0,2 µg/L per i sistemi marini.
Le informazioni sugli effetti dell'antimonio in ambienti acquatici sono scarse. La nuova direttiva europea, concernente la qualità delle acque potabili, recepita con D.Lgs. 31/2001, ha introdotto un limite più restrittivo per l'antimonio (5 µg/L). Obiettivi di qualità ancor più stringenti sono quelli previsti dal decreto del Ministero dell'Ambiente per la salvaguardia della laguna di Venezia (1,0 µg/L per il bacino scolante; 0,6 µg/L e 0,2 µg/L, valori imperativo e guida, rispettivamente, per la laguna).

METODO A - Determinazione per spettrometria di assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica (ETA-AAS)

1. Principio del metodo

L'antimonio viene determinato per iniezione diretta del campione nel fornetto di grafite di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico. Dalla misura del segnale di assorbanza a 217,6 nm si ricava la concentrazione mediante confronto con una curva di taratura ottenuta con soluzioni a concentrazioni note di analita, comprese nel campo di indagine analitico.

2. Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione dell'antimonio in campioni di acque naturali e di scarico nell'intervallo di concentrazione da 5,0 a 50,0 µg/L. Per concentrazioni superiori a 50 µg/L è possibile rientrare nell'intervallo indicato ricorrendo alla diluizione del campione.
Effettuando 10 determinazioni su uno stesso campione avente un contenuto di antimonio pari a 5,0 µg/L, alternate con una misura del bianco, si è potuto calcolare un limite di rivelabilità, espresso come tre volte lo scarto tipo di 1,0 µg/L (volume iniettato: 25 µL di campione e 25 µL di modificante). Tale limite dipende dalla matrice e dalle condizioni strumentali applicate; può essere leggermente migliorato aumentando il volume di campione iniettato. Tuttavia applicando queste modalità vengono esaltati gli effetti delle specie interferenti.

3. Interferenze e cause di errore

L'utilizzo del correttore di fondo consente di minimizzare gli assorbimenti aspecifici eventualmente presenti. Nel caso in cui si debba determinare l'analita in una matrice sconosciuta o scarsamente caratterizzata è consigliabile ricorrere al metodo delle aggiunte note. Tale metodo permette di minimizzare le interferenze di tipo fisico e/o chimico eventualmente presenti. Il ricorso ad un idoneo modificatore consente di rendere la matrice più volatile o di formare composti più stabili con l'elemento in esame; mediante un opportuno ciclo elettrotermico è possibile allontanare la matrice senza perdere l'analita di interesse.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". In particolare, considerando le basse concentrazioni da determinare, si consiglia di conservare i campioni in bottiglie di polipropilene o altro materiale caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli, precedentemente trattate con HNO_3 1 M per una notte e successivamente neutralizzate con acqua ad elevato grado di purezza. Per determinare soltanto l'antimonio disciolto, il campione viene filtrato dopo il prelievo su membrana da 0,45 µm (acetato di cellulosa o policarbonato) e acidificato fino a pH<2 con HNO_3 (6.1). L'analisi deve essere effettuata prima possibile e comunque il campione acidificato rimane stabile per almeno una settimana dal prelievo. Per la determinazione quantitativa dell'antimonio totale si rimanda alle Sezioni 3000 e 3010.
È buona norma considerare sempre l'opportunità di predisporre un "bianco di campo", ottenuto semplicemente mediante lo stoccaggio di un'aliquota di acqua ultrapura in un recipiente identico a quello dei prelievi, da sottoporre successivamente a tutte le fasi analitiche previste per i campioni. Altri sistemi di controllo della qualità del campionamento consistono nell'uso di campioni replicati, nell'attivazione di precauzioni per proteggere i campioni in modo da evitare qualsiasi possibile contaminazione, nell'avvinamento regolare dei recipienti.

5. Apparecchiature

5.1 Spettrofotometro di assorbimento atomico, corredato di fornetto di grafite e di dispositivo per la correzione degli assorbimenti aspecifici.

5.2 Lampada a catodo cavo o altra sorgente luminosa capace di emettere lo spettro dell'elemento in esame.

5.3 Autocampionatore oppure micropipette tarate per il dosaggio di pochi µL.

5.4 Dispositivo per la registrazione dell'assorbanza, adatto ad evidenziare la forma del picco.

5.5 Dispositivo che fornisce argon ultrapuro

6. Reattivi

Tutti i reattivi e l'acqua utilizzata per i lavaggi e la preparazione delle soluzioni di riferimento devono essere ad elevato grado di purezza.

6.1 Acido nitrico concentrato (d=1,40)

6.2 Soluzione concentrata di antimonio (1000 mg/L)

Si consiglia di utilizzare soluzioni di riferimento ad elevato grado di purezza disponibili in commercio.

6.3 Soluzione diluita di antimonio (2,0 mg/L)

Trasferire 200 µL della soluzione (6.2) in pallone tarato da 100 mL, aggiungere 1 mL di HNO_3 (6.1) e portare a volume con acqua ad elevato grado di purezza. Questa soluzione è stabile per almeno un mese se conservata a 4°C in un contenitore caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli (polietilene o policarbonato) e opportunamente chiuso in modo da evitare sia l'evaporazione del solvente che eventuali contaminazioni.

6.4 *Modificatore di matrice* (1000 mg/L palladio + acido citrico al 2%).

Sciogliere una quantità opportuna di palladio nitrato (preferibile) o palladio cloruro in acido nitrico 0,05 M. Quindi aggiungere 2 g di acido citrico come agente riducente (preferibile) o acido ascorbico in acqua deionizzata e portare a volume in matraccio tarato da 100 mL in polietilene. È possibile utilizzare anche altri modificatori seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento.

7. Procedimento

7.1 Ottimizzazione dei parametri strumentali

Per migliorare le prestazioni analitiche dell'apparecchiatura e per minimizzare eventuali interferenze, procedere all'ottimizzazione dei parametri strumentali seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento o in altri protocolli standardizzati. In Tabb. 1-2 sono elencate, a titolo di esempio, le condizioni operative tipiche per l'esecuzione delle analisi.

Tabella 1: Condizioni operative strumentali

Lunghezza d'onda (nm)	217,6
Fenditura (nm)	0,7
Rilevazione del segnale	altezza o area del picco
Correzione del fondo	attivata
Tubo	pirolitico
Intensità di corrente della lampada (mA)	come da specifica
Volume del campione (µL)	25
Volume del modificante di matrice (µL)	25

Tabella 2: Programma termico

	T°C	RT	HT	G	R
Essiccamento	120	20	20	300	
Incenerimento	1100	20	20	300	
Atomizzazione	2400	0	5	0	*
Pulizia	2600	1	5	300	

RT = tempo in secondi della rampa di temperatura
HT = tempo in secondi di permanenza alla temperatura impostata (isoterma)
T°C = temperatura impostata in °C
G = flusso del gas di lavaggio (argon ultrapuro) in mL/minuto
R = attivazione della lettura in atomizzazione.

Il ciclo elettrotermico riportato è valido nel caso in cui si utilizzi un tubo di grafite pirolitica; in tutti gli altri casi andrà ottimizzato, prendendo come riferimento quello generalmente consigliato dal manuale d'uso fornito a corredo dell'apparecchiatura.

7.2 Analisi

7.2.1 Determinazione diretta

Dopo aver impostato i parametri strumentali come descritto al Paragrafo 7.1, costruire la curva di taratura utilizzando almeno tre soluzioni di riferimento scelte nel campo di indagine analitico, preparate diluendo opportunamente la soluzione (6.3) e il bianco dei reattivi. Ripetere la misura di ogni soluzione di riferimento compreso il bianco almeno tre volte.
Quindi, eseguire l'analisi dei campioni effettuando almeno tre letture per ogni soluzione da analizzare; si considerano accettabili i valori che forniscono un coefficiente di variazione inferiore al 10%. Le analisi dei campioni, delle soluzioni di riferimento e del bianco dei reattivi devono essere effettuate nelle stesse condizioni strumentali. Se la risposta del campione incognito analizzato cade al di fuori dell'intervallo di linearità, diluire opportunamente il campione per riportarlo nel campo di linearità. Qualora risulti necessaria una diluizione del campione talmente elevata da esaltare gli errori connessi alla suddetta operazione è preferibile ripetere sia la taratura che l'analisi riducendo la quantità di campione iniettato nel fornetto di grafite oppure aumentando il flusso di gas di lavaggio in atomizzazione.
Nel caso in cui sia richiesta l'analisi di un numero notevole di campioni si consiglia di controllare la taratura inserendo ogni cinque campioni una soluzione di riferimento utilizzata per la taratura e verificando che il valore di quest'ultima risulti entro il ±5% del valore atteso.

7.2.2 Metodo delle aggiunte note

Il campione viene suddiviso in quattro aliquote, di cui una rimane tal quale, mentre alle altre si aggiungono concentrazioni crescenti dell'analita dello stesso ordine di grandezza di quella attesa per il campione. Misurare l'assorbanza delle quattro soluzioni e del bianco dei reattivi seguendo le indicazioni riportate al Paragrafo 7.1, avendo cura di ripetere le misure almeno tre volte. La concentrazione totale di antimonio presente nelle aliquote non deve superare il valore limite oltre il quale la risposta strumentale non è più lineare.

8. Calcoli

8.1 Determinazione diretta

La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le concentrazioni (µg/L) delle soluzioni di riferimento in ascissa e le assorbanze corrispondenti, corrette del bianco, in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%. Calcolare quindi la concentrazione di antimonio nel campione utilizzando l'equazione ottenuta dalla regressione lineare, tenendo conto dell'eventuale diluizione effettuata.

8.2 Metodo delle aggiunte

Siano C_1, C_2, C_3, rispettivamente le concentrazioni corrispondenti alla 1ª, 2ª, 3ª aggiunta e A_0, A_1, A_2, A_3, le assorbanze del campione (A_0) e del campione addizionato delle varie aggiunte, sottratte del bianco dei reattivi. Calcolare la retta di regressione che interpola i valori di assorbanza in funzione delle concentrazioni aggiunte, attribuendo al campione incognito di assorbanza A_0 una concentrazione "aggiunta" uguale a zero. La concentrazione incognita riferita al campione sarà data dal valore dell'intercetta sull'asse (x) cambiato di segno. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%.

9. Qualità del dato

Prove effettuate in quintuplicato da quattro laboratori su soluzioni sintetiche di acqua deionizzata hanno fornito i seguenti risultati:

Concentrazione attesa (µg/L)	5,0	20,0
Concentrazione trovata (µg/L)*	6,2 ± 1,4	18,0 ± 2,7
CV (%) intralaboratorio	9,5	4,3
CV (%) interlaboratorio	22,6	15,0
Accuratezza (%)**	24,0	10,0

** valor medio ± scarto tipo*

CV (%) = coefficiente di variazione; CV (%) = (scarto tipo/valore medio)•100

*** Non essendo stati utilizzati materiali di riferimento, l'accuratezza va intesa come grado di accordo tra il risultato della misurazione e il valore di riferimento accettato.*

Va tenuto presente che la precisione e accuratezza di un metodo generalmente peggiorano all'aumentare della complessità della matrice. L'EPA in uno studio condotto tra dieci laboratori riporta per campioni di acque di scarico, ad una concentrazione di 6,7 µg/L, una precisione del singolo analista pari al 26%, una precisione totale del 41% ed un'accuratezza del 64%.

Nota: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico". Caratterizzato il materiale di riferimento non certificato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, è possibile verificare gli scostamenti di misure giornaliere, condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.*

METODO B - Metodo per spettrometria di assorbimento atomico con formazione di idruri (HG-AAS)

1. Principio del metodo

L'antimonio viene determinato mediante spettroscopia di assorbimento atomico con generazione di idruri e lettura dell'assorbanza alla lunghezza d'onda di 217,6 nm utilizzando due possibili configurazioni strumentali: "batch system" oppure "flow injection". Il metodo si avvale di una preriduzione chimica con potassio ioduro a temperatura ambiente in cui avviene la riduzione dell'antimonio (V) ad antimonio (III). Successivamente l'antimonio (III), ridotto dal sodio boroidruro a SbH_3, viene vaporizzato in un sistema a circolazione chiusa e quindi trasferito mediante un gas inerte nella cella di misura mantenuta ad una temperatura di 1000°C tramite un mantello riscaldante.

2. Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione e la speciazione dell'antimonio nelle acque superficiali, sotterranee e potabili nell'intervallo di concentrazione 1-10 µg/L.
Il limite di rivelabilità del metodo è stato calcolato effettuando 10 determinazioni su uno stesso campione avente un contenuto di antimonio di 1,0 µg/L, alternate con una misura del bianco. Tale limite, espresso come tre volte lo scarto tipo delle dieci repliche, è risultato pari a 0,2 µg/L.

3. Interferenze e cause di errore

Per determinare quantitativamente l'antimonio (V) è indispensabile sottoporre il campione ad un trattamento preliminare di preriduzione con potassio ioduro. L'acido nitrico utilizzato per mineralizzare il metallo associato alla fase particolata o a composti metallorganici eventualmente presenti non interferisce nella determinazione. Nel caso in cui si debba determinare l'analita in una matrice nuova o scarsamente caratterizzata è consigliabile ricorrere al metodo delle aggiunte note. Tale metodo permette di minimizzare le interferenze di matrice. L'utilizzo del correttore di fondo consente di minimizzare gli assorbimenti aspecifici eventualmente presenti. L'acido fluoridrico interferisce nella determinazione dell'antimonio per concentrazioni >0,5 M. Tale interferenza può essere rimossa aumentando la concentrazione di acido cloridrico aggiunto (>1,5 M).

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". In particolare, considerando le basse concentrazioni da determinare, si consiglia di conservare i campioni in bottiglie di polietilene o altro materiale caratterizzato da scarsa capacità di cessione o adsorbimento di metalli, precedentemente trattate con HCl 1 M per una notte e successivamente neutralizzate con acqua ad elevato grado di purezza. Per determinare soltanto l'antimonio disciolto, il campione viene filtrato dopo il prelievo, su membrana da 0,45 µm (acetato di cellulosa o policarbonato) e acidificato fino a pH<2 con HCl (6.1). L'analisi deve essere effettuata prima possibile e comunque il campione acidificato rimane stabile per almeno una settimana dal prelievo. Per la determinazione della concentrazione di antimonio totale si rimanda alle Sezioni 3000 e 3010.
È buona norma considerare sempre l'opportunità di predisporre un "bianco di campo", ottenuto semplicemente mediante lo stoccaggio di un'aliquota di acqua ultrapura in un recipiente identico a quello dei prelievi, da sottoporre successivamente a tutte le fasi analitiche previste per i campioni. Altri sistemi di controllo della qualità del campionamento consistono nell'uso di campioni replicati, nell'adottare tutte le precauzioni necessarie per proteggere i campioni in modo da evitare qualsiasi possibile contaminazione, nell'avvinamento regolare dei recipienti.

5. Apparecchiature

5.1 Spettrofotometro di assorbimento atomico, che consenta il montaggio del sistema "batch" e del sistema "flow injection", corredato di dispositivo per la correzione degli assorbimenti aspecifici e possibilmente di sistema di intrappolamento dei vapori (vedi Appendice).

5.2 Lampada a catodo cavo o altra sorgente luminosa capace di emettere lo spettro dell'elemento in esame.

5.3 Cella di misura in quarzo con finestre di quarzo o altro materiale trasparente a 217,6 nm. La cella di misura è fissata alla camera del bruciatore; negli strumenti moderni può essere riscaldata a una temperatura di 1000°C tramite un apposito mantello riscaldante.

5.4 Sistema batch (vedi figura 1)

5.5 Sistema flow injection (vedi figura 2)

5.6 Dispositivo per la registrazione dell'assorbanza, adatto ad evidenziare la forma del picco.

5.7 Dispositivo che fornisce argon ultrapuro

6. Reattivi

Tutti i reattivi e l'acqua utilizzata per i lavaggi e la preparazione delle soluzioni di riferimento devono essere ad elevato grado di purezza.

6.1 Acido cloridrico concentrato (d=1,19)

6.2 Soluzione di preriduzione (KI 10%)

Sciogliere 10 g di KI in un matraccio di polietilene da 100 mL e portare a volume con acqua.

6.3 Soluzione di $NaBH_4$ al 3% in NaOH all'1% per sistema "batch".

Sciogliere 10 grammi di NaOH di grado ultrapuro in un matraccio di polietilene da 1 litro contenente circa 500 mL di H_2O ed aggiungere gradualmente e sotto agitazione 30 grammi di $NaBH_4$, quindi portare a volume con acqua. La soluzione così preparata è stabile per circa una settimana se conservata a temperatura non superiore a 4°C.

6.4 Soluzione di $NaBH_4$ (0,2 %) in NaOH (0,05%) per sistema "flow injection".

Sciogliere 0,5 grammi di NaOH di grado ultrapuro in matraccio di polietilene da 1 litro contenente circa 500 mL di H_2O ed aggiungere gradualmente e sotto agitazione 2 grammi di $NaBH_4$, quindi portare a volume con acqua. La soluzione così preparata è stabile per circa una settimana se conservata ad una temperatura non superiore a 4°C.

Nota: il sodio boroidruro libera idrogeno a contatto con acido, dovrà pertanto essere maneggiato con cura e conservato secondo le indicazioni del fornitore.

6.5 *Soluzione di riferimento concentrata* contenente 1000 mg/L di antimonio.

Si consiglia di utilizzare soluzioni di riferimento di antimonio ad elevato grado di purezza disponibili in commercio. Le soluzioni di riferimento per la taratura si ottengono per diluizioni successive della soluzione concentrata (6.5). Preparare almeno tre soluzioni di riferimento nel campo di applicabilità del metodo.

7. Procedimento

7.1 Preparazione del campione

Per determinare soltanto l'antimonio trivalente solubile, acidificare con HCl concentrato (6.1) fino ad avere una soluzione 0,3 M. In queste condizioni durante il processo di ossidoriduzione che porta alla formazione dell'idruro di antimonio (SbH_3) la forma pentavalente di antimonio non è ridotta e quindi non è determinata.
Per determinare l'antimonio totale solubile, Sb(III) + Sb(V), è necessario sottoporre il campione ad una preriduzione con ioduro di potassio. Al campione acidificato secondo le modalità precedentemente indicate si aggiunge 1 mL della soluzione di ioduro di potassio (6.2) per ogni 10 mL di campione. In queste condizioni la forma pentavalente di antimonio viene ridotta immediatamente ad antimonio trivalente a temperatura ambiente. Il risultato analitico che si ottiene è riferito all'antimonio totale solubile espresso come somma dell'antimonio (III) e dell'antimonio (V).

7.1.1 Ottimizzazione dei parametri strumentali con il sistema "batch"

Per migliorare le prestazioni analitiche dell'apparecchiatura e per minimizzare eventuali interferenze, procedere all'ottimizzazione dei parametri strumentali seguendo le indicazioni ri-

portate nel manuale d'uso dello strumento. In Tabb. 1-2 sono elencate, a titolo di esempio, le condizioni operative tipiche per l'esecuzione delle analisi con il sistema "batch" (Fig. 1).

Tabella 1: Condizioni operative strumentali	
Lunghezza d'onda (nm)	217,6
Fenditura (nm)	0,7
Rilevazione del segnale	altezza o area del picco
Correzione del fondo	attivata
Intensità di corrente della lampada (mA)	come da specifica
Volume del campione (mL)	10
Volume $NaBH_4$ (mL)	5

Tabella 2: Condizioni operative tipiche per l'analisi dell'antimonio con il sistema "batch"		
Purge 1	20 sec	
Reazione (riduzione con$NaBH_4$)	15 sec	lettura attivata
Purge 2	30 sec	
temp. cella	1000°C	

La fase "purge 1" ha lo scopo di eliminare dal campione composti volatili che possono interferire nella misura; per assicurare una eliminazione completa si può aumentare opportunamente la durata del "purge 1".
Durante la fase di reazione con $NaBH_4$ si forma SbH_3 che viene trasferito mediante un flusso di gas inerte (Ar) nella cella di misura.
La fase "purge 2" consente la pulizia del sistema e la sua preparazione alla lettura del campione successivo.

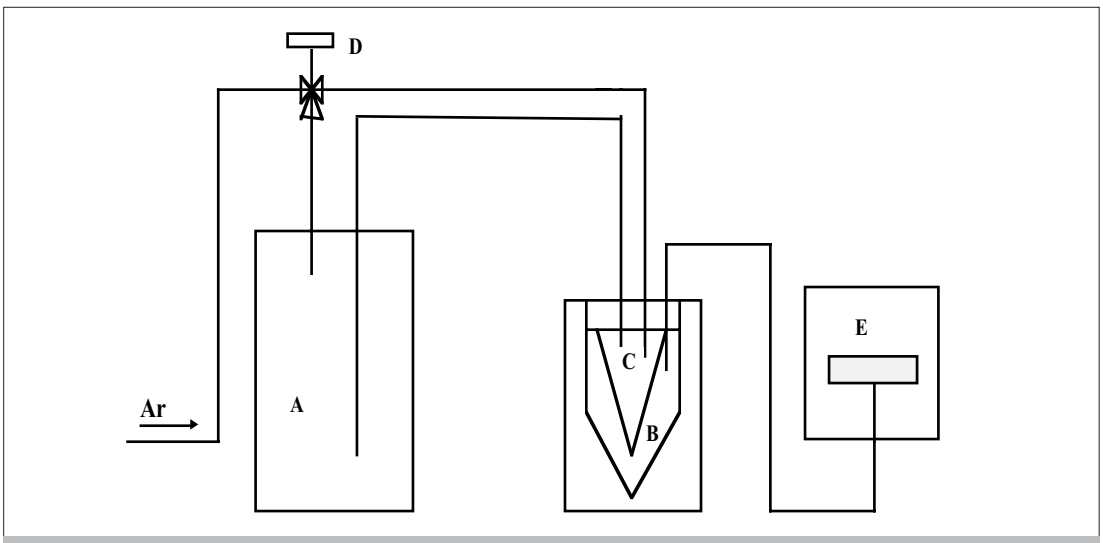


Figura 1: Esempio schematico del sistema "batch". A: recipiente del riducente; B: contenitore di reazione; C: cono di immissione del riducente; D: valvola multivie; E: cella di misura.

7.1.2 Ottimizzazione dei parametri strumentali con il sistema "flow injection"

Per migliorare le prestazioni analitiche dell'apparecchiatura e per minimizzare eventuali interferenze, procedere all'ottimizzazione dei parametri strumentali seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento. In Tabb. 1a-2a sono elencate, a titolo di esempio, le condizioni operative tipiche per l'esecuzione delle analisi con il sistema "flow injection" (Fig. 2).

Tabella 1a: Condizioni operative strumentali	
Lunghezza d'onda (nm)	217,6
Fenditura (nm)	0,7
Rilevazione del segnale	altezza o area del picco
Correzione del fondo	attivata
Intensità di corrente della lampada (mA)	come da specifica
Volume di campionamento (µL)	500
Temperatura cella (°C)	1000
Flusso di argon (mL/min)	90
Flusso "carrier" (HCl) (mL/min)	10
Flusso riducente ($NaBH_4$) (mL/min)	6

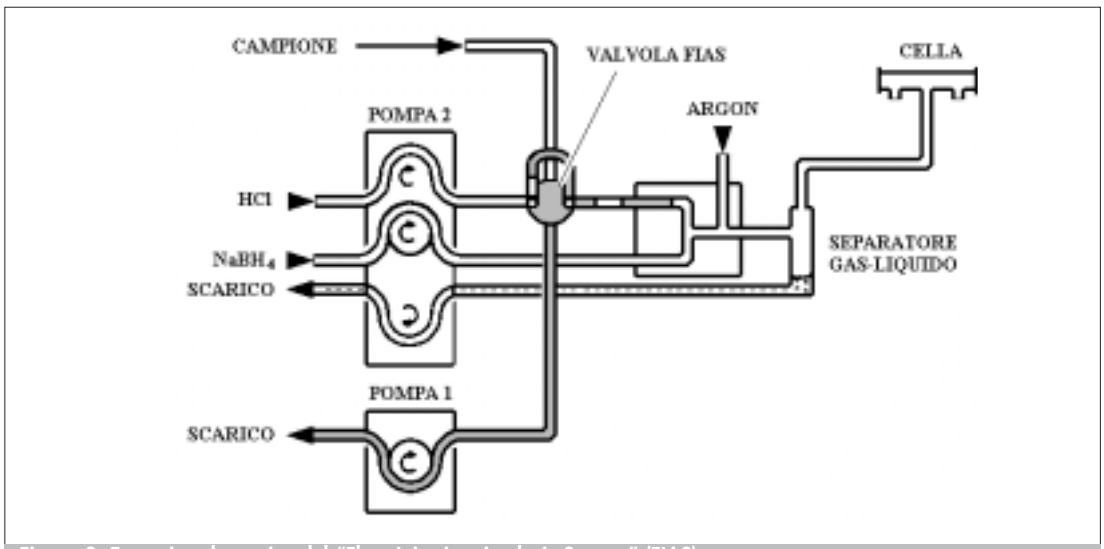


Figura 2: Esempio schematico del "Flow Iniection Analysis System" (FIAS).

Tabella 2a: Condizioni operative tipiche per l'analisi dell'antimonio con il sistema "flow injection"

Stadio	t(s)	P1 (rpm)	P2 (rpm)	Posizione valvola	lettura
0	15	sì	sì	riempimento	
1	10	sì	sì	riempimento	
2	1	no	sì	iniezione	sì

t(s) = tempo in secondi; P1, P2 = pompa 1, pompa 2; rpm = giri/min

7.2 Analisi

7.2.1 Determinazione diretta

Dopo aver impostato i parametri strumentali come descritto ai Sottoparagrafi 7.1.1 e 7.1.2 (nel caso che si adoperi, rispettivamente il sistema "batch" o "flow injection") costruire la curva di taratura utilizzando almeno tre soluzioni di riferimento scelte nel campo di indagine analitico, preparate diluendo opportunamente la soluzione concentrata (6.5), e il bianco dei reattivi. Ripetere la misura di ogni soluzione di riferimento compreso il bianco almeno tre volte. Effettuare il controllo sulla bontà della curva di taratura come riportato al Paragrafo 8.1. Quindi, eseguire l'analisi dei campioni provenienti dal trattamento descritto in (7.1) effettuando almeno tre repliche per ogni soluzione da analizzare; si considerano accettabili i valori che forniscono un coefficiente di variazione inferiore al 10%. Le analisi dei campioni, delle soluzioni di riferimento e del bianco dei reattivi devono essere effettuate nelle stesse condi-

zioni strumentali. Se la risposta del campione incognito analizzato cade al di fuori dell'intervallo di linearità, diluire opportunamente il campione per riportarlo nel campo di linearità. Nel caso in cui sia richiesta l'analisi di un numero notevole di campioni si consiglia di controllare la taratura inserendo ad intervalli regolari, da definire in funzione della stabilità della risposta strumentale, una soluzione di riferimento a concentrazione nota e verificando che il valore di quest'ultima risulti entro il ±5% del valore atteso.

7.2.2 Metodo delle aggiunte note

Il campione proveniente dal trattamento descritto in (7.1) viene suddiviso in quattro aliquote, di cui una rimane tal quale, mentre alle altre si aggiungono concentrazioni crescenti di antimonio dello stesso ordine di grandezza di quella attesa per il campione. Misurare l'assorbanza delle quattro soluzioni e del bianco dei reattivi, seguendo le indicazioni riportate in (7.2.1) avendo cura di ripetere le misure almeno tre volte. La concentrazione totale di antimonio presente nelle aliquote non deve superare il valore limite oltre il quale la risposta strumentale non è più lineare.

8. Calcoli

8.1 Determinazione diretta

La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le concentrazioni (µg/L) delle soluzioni di lavoro in ascissa e le assorbanze corrispondenti, corrette del bianco dei reattivi, in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%. Ricavare quindi la concentrazione di antimonio nel campione utilizzando l'equazione ottenuta dalla regressione lineare, tenendo conto dell'eventuale diluizione effettuata.

8.2 Metodo delle aggiunte

Siano C_1, C_2, C_3, rispettivamente le quantità corrispondenti alla 1°, 2°, 3° aggiunta e A_0, A_1, A_2, A_3, le assorbanze del campione (A_0) e del campione addizionato delle varie aggiunte, sottratte del bianco dei reattivi. Calcolare la retta di regressione che interpola i valori di assorbanza in funzione delle concentrazioni aggiunte, attribuendo al campione incognito di assorbanza A_0 una concentrazione "aggiunta" uguale a zero. La concentrazione incognita riferita al campione sarà data dal valore dell'intercetta sull'asse (x) cambiato di segno. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%.

9. Qualità del dato

Prove effettuate in quintuplicato da due laboratori, uno che ha utilizzato la procedura "batch" e l'altro la procedura "flow injection", su campioni di acqua deionizzata contenenti 0,5 µg/L; 1,0 µg/L; 2,0 µg/L; 5,0 µg/L e 10,0 µg/L di antimonio hanno fornito valori del coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100, entro il 5%.

Nota: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico". Caratterizzato il materiale di riferimento non certificato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, è possibile verificare gli scostamenti di misure giornaliere, condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.*

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA), 3-24 / 3-31.

Decreto Interministeriale del 23/4/1998, concernente i requisiti di qualità delle acque e caratteristiche degli impianti di depurazione per la tutela della laguna di Venezia, in G.U. n.140, del 18/6/1998.

Direttiva 98/83/CE del 3 novembre 1998, concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano, in G.U. delle Comunità Europee, L330/32 del 5.12.98.

IRSA (1986 a): "I metalli nelle acque: origine, distribuzione, metodi di rimozione", Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **71**, 9.

IRSA (1986 b): "Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **75**, 313-316.

MARTIN J.M. & WHITFIELD D.M. (1983): *"The significance of the river input of chemical elements to the ocean"*. In C.S. Wong et al. Trace Metals in Seawater, NATO Conf. Ser. IV, Plenum Press, 265-296.

UNICHIM (1996): "*Linee Guida per la taratura della strumentazione analitica – Spettrometri di assorbimento atomico ad atomizzazione elettrotermica (EAAS)*", Manuale 177/2, Milano.

APPENDICE

Raccomandazioni sull'uso in sicurezza di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico con generatore di idruri

I vapori di antimonio prodotti a seguito della reazione con sodio boroidruro sono tossici e rappresentano, se inalati, un serio pericolo per l'operatore. Si consiglia pertanto di procedere ad un intrappolamento di tali vapori. Ciò si realizza attraverso un sistema a circolazione chiusa come quello riportato in Fig. 3. I vapori di antimonio vengono trasportati mediante un flusso di gas inerte (Ar) attraverso il tubo (d) nella cella di misura (A), chiusa all'estremità da finestre (f) costituite di materiale trasparente a 217,6 nm. Successivamente vengono convogliati tramite i tubi di collegamento (e) prima in una trappola di essiccazione (B) e poi in una trappola (C) contenente un filtro a carbone attivo che trattiene l'antimonio. L'uscita della trappola a carbone attivo (g) è collegata, tramite un tubo, ad una cappa aspirante provvista anch'essa di filtro a carbone attivo. Il carbone attivo deve essere sostituito periodicamente e sottoposto a smaltimento nel rispetto delle normative vigenti.

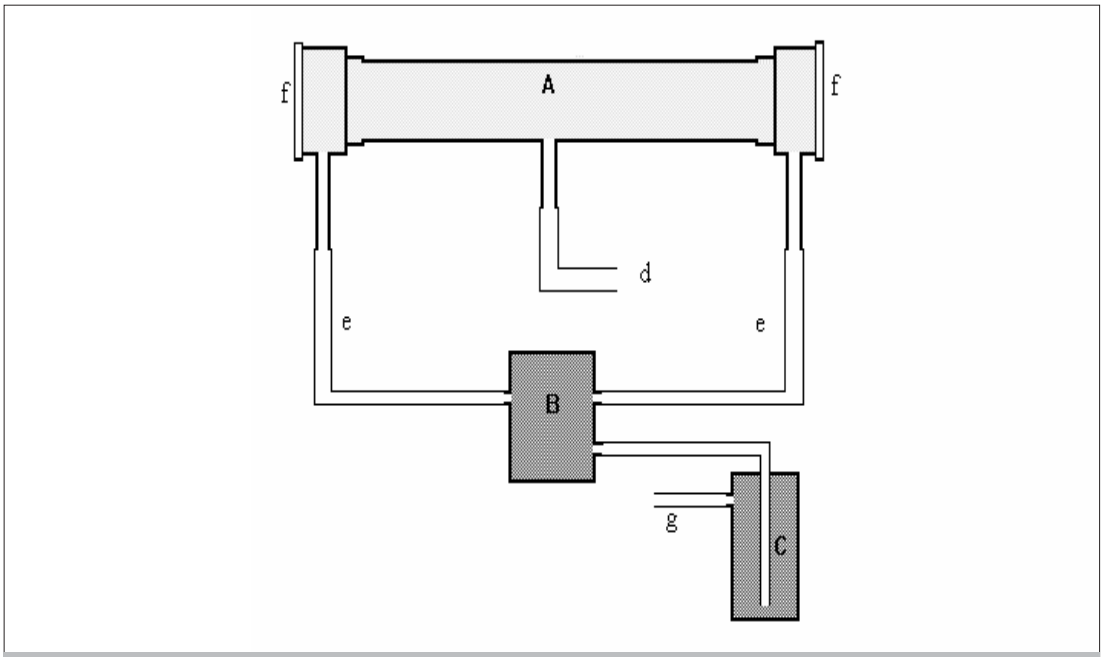


Figura 3: Descrizione schematica del sistema a circolazione chiusa utilizzato per intrappolare i vapori di antimonio.

3070. Argento

L'argento è un elemento raro; la sua abbondanza nella crosta terrestre è pari soltanto a 0,07 mg/kg. Il minerale più comune è il solfuro. L'argento viene utilizzato principalmente nella produzione di materiale fotografico e nell'industria elettrica ed elettronica.
L'argento può esistere in due stati di valenza: (0) e (I). In condizioni ossidanti la specie prevalente è l'Ag^+, o per meglio dire il complesso AgCl(aq). Al di sotto di valori del potenziale redox di 0,4 V è stabile la specie Ag(0) (Ag metallico) e per valori ossidoriduttivi ancora più bassi, e in presenza di ione solfuro, precipita l'Ag_2S. L'Ag (I) viene ridotto ad argento metallico dallo ione ferroso che si ossida a ione ferrico con conseguente diminuzione della solubilità dell'argento che può essere ulteriormente esaltata dalla coprecipitazione da parte dell'idrossido ferrico.
Per acque dolci incontaminate viene indicata una concentrazione di riferimento di 0,003 µg/L, mentre per le acque di mare il valore è di circa un ordine di grandezza più basso.
L'argento non è elemento essenziale ed esercita effetti tossici sugli organismi acquatici già a basse concentrazioni. Criteri di qualità proposti da vari enti internazionali (ente di protezione ambientale canadese, US EPA, WRC-UK) forniscono per l'argento solubile un intervallo di valori (0,1-0,9 µg/L) per la protezione della vita acquatica e un valore di 10 µg/L per le acque destinate al consumo umano.
Il D.Lgs. 152/99 in materia di tutela delle acque dall'inquinamento prevede un criterio di qualità di 10 µg/L per le acque sotterranee.

METODO A - Determinazione per spettrometria di assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica (ETA-AAS)

1. Principio del metodo

L'argento viene determinato per iniezione diretta del campione nel fornetto di grafite di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico. Dalla misura del segnale di assorbanza a 328,1 nm si ricava la concentrazione mediante confronto con una curva di taratura ottenuta con soluzioni a concentrazioni note di analita, comprese nel campo di indagine analitico.

2. Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione dell'argento in campioni di acque naturali e di scarico nell'intervallo di concentrazione da 0,5 a 10,0 µg/L. Per concentrazioni superiori a 10 µg/L è possibile rientrare nell'intervallo indicato ricorrendo alla diluizione del campione.
Effettuando 10 determinazioni su uno stesso campione avente un contenuto di argento pari a 0,5 µg/L, alternate con una misura del bianco, si è potuto calcolare un limite di rivelabilità, espresso come tre volte lo scarto tipo, di 0,1 µg/L (volume di campione iniettato: 25 µL). Tale limite dipende dalla matrice e dalle condizioni strumentali applicate; può essere leggermente migliorato aumentando il volume di campione iniettato. Tuttavia applicando queste modalità vengono esaltati gli effetti delle specie interferenti.

3. Interferenze e cause di errore

L'utilizzo del correttore di fondo consente di minimizzare gli assorbimenti aspecifici eventualmente presenti. Nel caso in cui si debba determinare l'analita in una matrice sconosciuta o scarsamente caratterizzata è consigliabile ricorrere al metodo delle aggiunte note. Tale metodo permette di minimizzare le interferenze di tipo fisico e/o chimico eventualmente presenti.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". In particolare, considerando le basse concentrazioni da determinare, si consiglia di conservare i campioni in bottiglie di polipropilene o altro materiale caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli, precedentemente trattate con HNO_3 1 M per una notte e successivamente neutralizzate con acqua ad elevato grado di purezza. Per determinare soltanto l'argento disciolto, il campione viene filtrato dopo il prelievo su membrana da 0,45 µm (acetato di cellulosa o policarbonato) e acidificato fino a pH<2 con HNO_3 (6.1). L'analisi deve essere effettuata prima possibile e comunque il campione acidificato rimane stabile per almeno una settimana dal prelievo. Per la determinazione quantitativa dell'argento totale si rimanda alle Sezioni 3000 e 3010.
È buona norma considerare sempre l'opportunità di predisporre un "bianco di campo", ottenuto semplicemente mediante lo stoccaggio di un'aliquota di acqua ultrapura in un recipiente identico a quello dei prelievi, da sottoporre successivamente a tutte le fasi analitiche previste per i campioni. Altri sistemi di controllo della qualità del campionamento consistono nell'uso di campioni replicati, nell'attivazione di precauzioni per proteggere i campioni in modo da evitare qualsiasi possibile contaminazione, nell'avvinamento regolare dei recipienti.

5. Apparecchiature

5.1 Spettrofotometro di assorbimento atomico, corredato di fornetto di grafite e di dispositivo per la correzione degli assorbimenti aspecifici.

5.2 Lampada a catodo cavo o altra sorgente luminosa capace di emettere lo spettro dell'elemento in esame.

5.3 Autocampionatore oppure micropipette tarate per il dosaggio di pochi µL.

5.4 Dispositivo per la registrazione dell'assorbanza, adatto ad evidenziare la forma del picco.

5.5 Dispositivo che fornisce argon ultrapuro

6. Reattivi

Tutti i reattivi e l'acqua utilizzata per i lavaggi e la preparazione delle soluzioni di riferimento devono essere ad elevato grado di purezza.

6.1 Acido nitrico concentrato (d=1,40)

6.2 Soluzione concentrata di argento (1000 mg/L)

Si consiglia di utilizzare soluzioni di riferimento ad elevato grado di purezza disponibili in commercio.

6.3 Soluzione diluita di argento (2,0 mg/L)

Trasferire 200 µL della soluzione (6.2) in pallone tarato da 100 mL, aggiungere 1 mL di HNO_3 (6.1) e portare a volume con acqua ad elevato grado di purezza. Questa soluzione è stabile per almeno un mese se conservata a 4°C in un contenitore caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli (polietilene o policarbonato) e opportunamente chiuso in modo da evitare sia l'evaporazione del solvente che eventuali contaminazioni.

7. Procedimento

7.1 Ottimizzazione dei parametri strumentali

Per migliorare le prestazioni analitiche dell'apparecchiatura e per minimizzare eventuali interferenze, procedere all'ottimizzazione dei parametri strumentali seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento o in altri protocolli standardizzati. In Tabb. 1-2 sono elencate, a titolo di esempio, le condizioni operative tipiche per l'esecuzione delle analisi.

Tabella 1: Condizioni operative strumentali

Lunghezza d'onda (nm)	328,1
Fenditura (nm)	0,7
Rilevazione del segnale	altezza o area del picco
Correzione del fondo	attivata
Tubo	pirolitico
Intensità di corrente della lampada (mA)	come da specifica
Volume del campione (µL)	25

Tabella 2: Programma termico

	T°C	RT	HT	G	R
Essiccamento	120	20	20	300	
Incenerimento	600	30	20	300	
Atomizzazione	2200	0	5	0	*
Pulizia	2600	1	5	300	

RT = tempo in secondi della rampa di temperatura
HT = tempo in secondi di permanenza alla temperatura impostata (isoterma)
T°C = temperatura impostata in °C
G = flusso del gas di lavaggio (argon ultrapuro) in mL/minuto
R = attivazione della lettura in atomizzazione.

Il ciclo elettrotermico riportato è valido nel caso in cui si utilizzi un tubo di grafite pirolitica; in tutti gli altri casi andrà ottimizzato, prendendo come riferimento quello generalmente consigliato dal manuale d'uso fornito a corredo dell'apparecchiatura.

7.2 Analisi

7.2.1 Determinazione diretta

Dopo aver impostato i parametri strumentali come descritto al Paragrafo 7.1, costruire la curva di taratura utilizzando almeno tre soluzioni di riferimento scelte nel campo di indagine analitico, preparate diluendo opportunamente la soluzione (6.3), e il bianco dei reattivi. Ripetere la misura di ogni soluzione di riferimento compreso il bianco almeno tre volte.
Quindi, eseguire l'analisi dei campioni effettuando almeno tre letture per ogni soluzione da analizzare; si considerano accettabili i valori che forniscono un coefficiente di variazione in-

feriore al 10%. Le analisi dei campioni, delle soluzioni di riferimento e del bianco dei reattivi devono essere effettuate nelle stesse condizioni strumentali. Se la risposta del campione incognito analizzato cade al di fuori dell'intervallo di linearità, diluire opportunamente il campione per riportarlo nel campo di linearità. Qualora risulti necessaria una diluizione del campione talmente elevata da esaltare gli errori connessi alla suddetta operazione è preferibile ripetere sia la taratura che l'analisi riducendo la quantità di campione iniettato nel fornetto di grafite oppure aumentando il flusso di gas di lavaggio in atomizzazione.
Nel caso in cui sia richiesta l'analisi di un numero notevole di campioni si consiglia di controllare la taratura inserendo ogni cinque campioni una soluzione di controllo utilizzata per la taratura e verificando che il valore di quest'ultima risulti entro il ±5% del valore atteso.

7.2.2 Metodo delle aggiunte note

Il campione viene suddiviso in quattro aliquote, di cui una rimane tal quale, mentre alle altre si aggiungono concentrazioni crescenti dell'analita dello stesso ordine di grandezza di quella attesa per il campione. Misurare l'assorbanza delle quattro soluzioni e del bianco dei reattivi seguendo le indicazioni riportate al Paragrafo 7.1, avendo cura di ripetere le misure almeno tre volte. La concentrazione totale di argento presente nelle aliquote non deve superare il valore limite oltre il quale la risposta strumentale non è più lineare.

8. Calcoli

8.1 Determinazione diretta

La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le concentrazioni (μg/L) delle soluzioni di riferimento in ascissa e le assorbanze corrispondenti, corrette del bianco, in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%. Calcolare quindi la concentrazione dell'argento nel campione utilizzando l'equazione ottenuta dalla regressione lineare, tenendo conto dell'eventuale diluizione effettuata.

8.2 Metodo delle aggiunte

Siano C_1, C_2, C_3, rispettivamente le concentrazioni corrispondenti alla 1ª, 2ª, 3ª aggiunta e A_0, A_1, A_2, A_3, le assorbanze del campione (A_0) e del campione addizionato delle varie aggiunte, sottratte del bianco dei reattivi. Calcolare la retta di regressione che interpola i valori di assorbanza in funzione delle concentrazioni aggiunte, attribuendo al campione incognito di assorbanza A_0 una concentrazione "aggiunta" uguale a zero. La concentrazione incognita riferita al campione sarà data dal valore dell'intercetta sull'asse (x) cambiato di segno. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%.

9. Qualità del dato

Prove effettuate in triplicato da tre laboratori su soluzioni sintetiche di acqua deionizzata contenenti 1,0 μg/L e 25,0 μg/L di argento hanno fornito valori del coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100, pari, rispettivamente, a 9,3% e 1,8%.
Va tenuto presente che la precisione e accuratezza di un metodo generalmente peggiorano all'aumentare della complessità della matrice. Non essendo stati utilizzati materiali di riferimento, l'accuratezza va intesa come grado di accordo tra il risultato delle misurazione e il valore di riferimento accettato. Su campioni di acque di scarico, ad una concentrazione di 8,5 μg/L lo Standard Methods riporta una riproducibilità del 34% ed un'accuratezza del 20%.

Nota: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recen-*

ti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".
Caratterizzato il materiale di riferimento non certificato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, è possibile verificare gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

METODO B - Determinazione previa concentrazione dell'analita ed analisi in spettrometria di assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica (ETA-AAS)

1. Principio del metodo

L'argento viene determinato in assorbimento atomico con fornetto di grafite alla lunghezza d'onda di 328,1 nm dopo un doppio processo di estrazione-concentrazione. In una prima fase l'argento viene complessato a pH=4,0 con pirrolidinditiocarbammato d'ammonio (APDC) e il complesso estratto in cloroformio.
Successivamente il complesso viene riportato in una fase minerale più stabile per estrazione dalla fase organica con HNO_3 7,5 M.

2. Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione dell'argento in campioni di acque naturali nell'intervallo di concentrazione da 0,01 a 1,0 µg/L. Concentrazioni più elevate possono essere determinate direttamente senza ricorrere al trattamento di preconcentrazione (vedi metodo A).

3. Interferenze e cause di errore

Vale quanto riportato al Capitolo 3 del metodo A. I cloruri non interferiscono fino a concentrazioni di 5000 mg/L.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". In particolare, considerando le basse concentrazioni da determinare, si consiglia di conservare i campioni in bottiglie scure di polipropilene o altro materiale caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli, precedentemente trattate con HNO_3 1 M per una notte e successivamente neutralizzate con acqua ad elevato grado di purezza. Dati i bassi livelli di concentrazione in cui il metodo opera, lo stesso è rivolto essenzialmente alla determinazione dell'argento disciolto, ottenibile dopo filtrazione immediata del campione attraverso un filtro di policarbonato da 0,45 µm.
È buona norma considerare sempre l'opportunità di predisporre un "bianco di campo", ottenuto semplicemente mediante lo stoccaggio di un'aliquota di acqua ultrapura in un recipiente identico a quello dei prelievi, da sottoporre successivamente a tutte le fasi analitiche previste per i campioni. Altri sistemi di controllo della qualità del campionamento consistono nell'uso di campioni replicati, nell'attivazione di precauzioni per proteggere i campioni in modo da evitare qualsiasi possibile contaminazione, nell'avvinamento regolare dei recipienti.

5. Apparecchiature

5.1 Normale vetreria di laboratorio

Tutta la vetreria deve essere preventivamente lavata con acido nitrico diluito (1+9) e accuratamente risciacquata con acqua distillata ad elevata purezza.

5.2 Spettrofotometro di assorbimento atomico, corredato di fornetto di grafite e di dispositivo per la correzione degli assorbimenti aspecifici.

5.3 Lampada a catodo cavo o altra sorgente luminosa capace di emettere lo spettro dell'elemento in esame.

5.4 Autocampionatore oppure micropipette tarate per il dosaggio di pochi µL.

5.5 Dispositivo per la registrazione dell'assorbanza, adatto ad evidenziare la forma del picco.

5.6 Dispositivo che fornisce argon ultrapuro

5.7 pHmetro, corredato possibilmente di elettrodo combinato.

5.8 Apparato di filtrazione sotto vuoto o sotto pressione e filtri in policarbonato da 0,45 µm

6. Reattivi

Tutti i reattivi e l'acqua utilizzata per i lavaggi e la preparazione delle soluzioni di riferimento devono essere ad elevato grado di purezza.

6.1 Acido nitrico concentrato (d=1,40)

6.2 Acido acetico glaciale

6.3 Acido Acetico 1:1

Versare 25 mL di acido acetico (6.2) e 25 mL di acqua distillata in matraccio tarato da 50 mL.

6.4 Soluzione concentrata di ammoniaca (30% NH_3, d=0,89)

6.5 Ammonio pirrolidinditiocarbammato (APDC) all'1% $\left(\frac{P}{V}\right)$

Sciogliere 250 mg di APDC in 25 mL di acqua distillata.

6.6 Ammonio acetato 2 M (pH=5,4±0,1)

Versare 600 mL di acqua distillata in un matraccio da 1 L. Aggiungere 115 mL di acido acetico glaciale ultrapuro (6.2) e agitare. Aggiungere lentamente 148 mL di soluzione concentrata di ammoniaca (6.4). Agitare e portare a volume. Controllare il pH.

6.7 Cloroformio puro per assorbimento atomico

6.8 Soluzione concentrata di argento (1000 mg/L)

Si consiglia di utilizzare soluzioni di riferimento ad elevato grado di purezza disponibili in commercio.

6.9 Soluzione di argento a concentrazione intermedia (10,0 mg/L)

Trasferire 1 mL della soluzione (6.8) in pallone tarato da 100 mL, aggiungere 1 mL di HNO_3 (6.1) e portare a volume con acqua ad elevato grado di purezza. Questa soluzione è stabile per almeno un mese se conservata a 4°C in un contenitore scuro caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli (polietilene o policarbonato) e opportunamente chiuso in modo da evitare sia l'evaporazione del solvente che eventuali contaminazioni.

6.10 *Soluzione diluita di argento (100 µg/L)*

Trasferire 1 mL della soluzione (6.9) in pallone tarato da 100 mL, aggiungere 1 mL di HNO_3 (6.1) e portare a volume con acqua ad elevato grado di purezza. Questa soluzione va preparata giornalmente.

7. Procedimento

7.1 Dosaggio del campione

Trasferire 200 mL di campione in un imbuto separatore, portare il pH a 4,0 con ammonio acetato 2 M (6.6). Aggiungere 0,5 mL di APDC all'1%, agitare vigorosamente per 3-4 minuti, aggiungere 5 mL di cloroformio ed agitare nuovamente per 2 minuti. Lasciare riposare la fase organica e quindi trasferirla in una provetta di vetro pulita da 20 mL. Ripetere l'estrazione una seconda volta, recuperare la fase organica e aggiungerla alla precedente.
Addizionare alla provetta 500 µL di HNO_3 concentrato per distruggere il complesso APDC-Ag, prelevare 25 µL della fase acquosa che si stratifica nella parte superiore della provetta, ed iniettarli direttamente nel fornetto applicando le condizioni operative riportate nel metodo A.

7.2 Taratura

È consigliabile operare con il metodo delle aggiunte, (anche se alcune prove hanno dimostrato che le assorbanze di riferimenti interni ottenuti per aggiunta dell'analita al campione sono in ottimo accordo con quelle relative a soluzioni di riferimento esterne). Suddividere il campione in quattro aliquote, di cui una rimane tal quale, mentre alle altre si aggiungono concentrazioni crescenti dell'analita dello stesso ordine di grandezza di quella attesa per il campione. Misurare l'assorbanza delle quattro soluzioni e del bianco dei reattivi seguendo le indicazioni riportate al Paragrafo 7.1 del metodo A, avendo cura di ripetere le misure almeno tre volte. La concentrazione totale di argento presente nelle aliquote non deve superare il valore limite oltre il quale la risposta strumentale non è più lineare.

8. Calcoli

8.1 Metodo delle aggiunte

Siano C_1, C_2, C_3, rispettivamente le concentrazioni corrispondenti alla 1ª, 2ª, 3ª aggiunta e A_0, A_1, A_2, A_3, le assorbanze del campione (A_0) e del campione addizionato delle varie aggiunte, sottratte del bianco dei reattivi. Calcolare la retta di regressione che interpola i valori di assorbanza in funzione delle concentrazioni aggiunte, attribuendo al campione incognito di assorbanza A_0 una concentrazione "aggiunta" uguale a zero. La concentrazione incognita riferita al campione sarà data dal valore dell'intercetta sull'asse (x) cambiato di segno. La re-

gressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%.

9. Qualità del dato

Prove effettuate (n=5) da tre laboratori su campioni di acque superficiali addizionate con 0,025 µg/L e 0,05 µg/L di argento hanno fornito valori del coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100, entro il 9% e un'accuratezza entro il 22%.
Non essendo stati utilizzati materiali di riferimento, l'accuratezza va intesa come grado di accordo tra il risultato della misurazione e il valore di riferimento accettato.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA), 3-24/3-31.

BRULAND W.K. & COALE K.H. (1985): "Analysis of seawater for dissolved cadmium, copper and lead: an intercomparison of voltammetric and atomic absorption methods", *Mar. Chem.*, **17**, 285-300.

FLEGAL A.R., SAÑUDO-WILHELMY S.A. & SCELFO G.M. (1995): "Silver in the eastern Atlantic Ocean", *Mar. Chem.*, **49**, 315-320.

IRSA (1986 a): "I metalli nelle acque: origine, distribuzione, metodi di rimozione", Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **71**, 21-22.

IRSA (1986 b): "Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **75**, 263-278.

SMITH G.J. & FLEGAL A.R. (1993): "Silver in San Francisco Bay estuarine waters", *Estuaries*, **16**, (3A), 547-558.

UNICHIM (1996): "*Linee Guida per la taratura della strumentazione analitica – Spettrometri di assorbimento atomico ad atomizzazione elettrotermica (EAAS)*", Manuale 177/2, Milano.

3080. Arsenico

L'arsenico è ampiamente distribuito nella crosta terrestre con una concentrazione media di 1,8 mg/kg. Gli usi principali dell'arsenico riguardano la fabbricazione del vetro, la produzione di leghe con rame e zinco e la produzione di semiconduttori. Composti dell'arsenico sono anche utilizzati in medicina veterinaria,come pesticidi e come conservanti per il legno. La fusione e l'arrostimento di minerali contenenti solfuri e la combustione di combustibili fossili (specialmente carbone) sono tra i processi principali che rilasciano arsenico, ma non vanno trascurati i processi di erosione naturale.
L'arsenico è presente in natura in quattro stati di ossidazione (+5, +3, 0, -3), mentre nelle acque naturali si presenta sotto le forme di arsenito (+3), arseniato (+5) e derivati organici. Il rapporto tra le forme arsenito e arseniato è funzione delle condizioni redox presenti e del pH. È anche possibile la metilazione biologica di composti inorganici di arsenico con la conseguente formazione di trimetilarsina, $(CH_3)_3As$, e acido dimetilarsenico, $(CH_3)_2AsOOH$.
Tra gli elementi metallici è uno dei più mobili sia nell'idrosfera che nell'atmosfera.
Per acque dolci incontaminate viene indicata una concentrazione di riferimento di circa 1 µg/L, mentre per le acque di mare il valore è leggermente più elevato, 1,2 µg/L.
Le differenti forme di arsenico hanno non solo comportamenti chimici diversi ma anche differenti tossicità e modalità di interazione con gli organismi acquatici.
Criteri di qualità proposti da vari enti internazionali (ente di protezione ambientale canadese, US EPA, WRC-UK) forniscono per la protezione della vita acquatica un intervallo di valori compresi tra 25 e 50 µg/L per l'arsenico disciolto totale.
Per le acque destinate al consumo umano la direttiva europea, recepita con D.Lgs. 31/2001, ha abbassato il limite e fissa una concentrazione massima ammissibile di 10 µg/L; alcune fonti ritengono comunque tale valore ancora non sufficientemente protettivo per la salute umana.
Il D.Lgs. 152/99 in materia di tutela delle acque dall'inquinamento prevede criteri di qualità diversificati in funzione degli usi (10 µg/L per le acque sotterranee; 10-100 µg/L, in funzione dei trattamenti chimico-fisici previsti, per le acque superficiali destinate alla potabilizzazione; 50 µg/L per le acque idonee alla vita dei pesci).

METODO A - Determinazione mediante assorbimento atomico con formazione di idruri (HG-AAS)

1. Principio del metodo

Il metodo si basa sulla reazione di As (III) con sodio boroidruro per formare l'idruro di arsenico (AsH_3). Poiché nelle acque naturali e di scarico l'arsenico può essere presente oltre che come As (III) anche come As(V), specie che non dà reazione con il sodio boroidruro, è necessario convertire preliminarmente tutte le forme di arsenico ad As (III). In assenza di forme organiche, la riduzione da As (V) a As (III) può effettuarsi con HCl 4 M in presenza di KI; qualora si sospetti la presenza di specie organiche di arsenico é necessario sottoporre il campione ad un procedimento di mineralizzazione ossidativa per portare tutte le forme del metallo a As (V) e quindi ridurle a As (III).
Successivamente l'arsenico (III), ridotto dal sodio boroidruro a AsH_3, viene vaporizzato in un sistema a circolazione chiusa e quindi trasferito mediante un gas inerte nella cella di misura mantenuta ad una temperatura di 1000°C tramite un mantello riscaldante (Fig.1).
Dalla misura del segnale di assorbanza a 193,7 nm si ricava la concentrazione mediante

confronto con una curva di taratura ottenuta con soluzioni a concentrazioni note di analita, comprese nel campo di indagine analitico.

2. Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione dell'arsenico nelle acque naturali (dolci e di mare), sotterranee, potabili e di scarico nell'intervallo di concentrazione compreso tra 0,5 e 10 µg/L. Per concentrazioni superiori a 10 µg/L è possibile rientrare nell'intervallo indicato ricorrendo alla diluizione del campione.
Effettuando 10 determinazioni su uno stesso campione avente un contenuto di arsenico di 0,5 µg/L, alternate con una misura del bianco, si è potuto calcolare un limite di rivelabilità, espresso come tre volte lo scarto tipo, di 0,1 µg/L.

3. Interferenze e cause di errore

L'acido nitrico utilizzato per mineralizzare il metallo associato alla fase particolata o a composti metallorganici eventualmente presenti non interferisce nella determinazione. Nel caso in cui si debba determinare l'analita in una matrice sconosciuta o scarsamente caratterizzata è consigliabile ricorrere al metodo delle aggiunte note. Tale metodo permette di minimizzare le interferenze di matrice. L'utilizzo del correttore di fondo consente di minimizzare gli assorbimenti aspecifici eventualmente presenti.
La maggior parte delle interferenze viene praticamente eliminata poiché l'idruro di arsenico volatile viene allontanato in fase gassosa, lasciando in soluzione le sostanze potenzialmente interferenti. Non si hanno interferenze significative da parte di altri elementi, almeno ai livelli di concentrazione normalmente riscontrabili nelle acque. Molti metalli (Cr, Co, Cu, Hg, Ni, Mo, Ag, Se) impediscono l'ottenimento di rese quantitative nello sviluppo dell'arsina a livelli di concentrazione superiori di 100 volte in peso rispetto all'arsenico presente.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". In particolare, considerando le basse concentrazioni da determinare, si consiglia di conservare i campioni in bottiglie di politene o altro materiale caratterizzato da scarsa capacità di cessione o adsorbimento di metalli, precedentemente trattate con HCl 1 M per una notte e successivamente neutralizzate con acqua ad elevato grado di purezza. Per determinare soltanto l'arsenico disciolto, il campione viene filtrato dopo il prelievo, su membrana da 0,45 µm (acetato di cellulosa o policarbonato) e acidificato fino a pH<2 con HCl (6.1). L'analisi deve essere effettuata prima possibile e comunque il campione acidificato rimane stabile per almeno una settimana dal prelievo.
La concentrazione di arsenico totale può essere ottenuta dalla somma delle frazioni solubili di arsenico (III) e arsenico (V) e della frazione particolata, analizzate separatamente, oppure effettuando un trattamento di mineralizzazione del campione tal quale, (ad esempio sottoponendo il campione acidificato con HNO_3 a mineralizzazione in forno a microonde) (vedi Sezione 3010).
È buona norma considerare sempre l'opportunità di predisporre un "bianco di campo", ottenuto semplicemente mediante lo stoccaggio di un'aliquota di acqua ultrapura in un recipiente identico a quello dei prelievi, da sottoporre successivamente a tutte le fasi analitiche previste per i campioni. Altri sistemi di controllo della qualità del campionamento consistono nell'uso di campioni replicati, nell'adottare tutte le precauzioni necessarie per proteggere i campioni in modo da evitare qualsiasi possibile contaminazione, nell'avvinamento regolare dei recipienti.

5. Apparecchiature

5.1 Spettrofotometro di assorbimento atomico, che consenta il montaggio del sistema a sviluppo di idruri, corredato di dispositivo per la correzione degli assorbimenti aspecifici e possibilmente di sistema di intrappolamento dei vapori (vedi Appendice).

5.2 Lampada a catodo cavo o altra sorgente luminosa capace di emettere lo spettro dell'elemento in esame.

5.3 Cella di misura in quarzo con finestre di quarzo o altro materiale trasparente a 193,7 nm. La cella di misura è fissata alla camera del bruciatore e riscaldata ad una temperatura di 1000°C tramite un apposito mantello riscaldante.

5.4 Sistema "batch automatizzato" (vedi Fig. 1) o sistema manuale (vedi Fig. 2)

5.5 Dispositivo per la registrazione dell'assorbanza, adatto ad evidenziare la forma del picco.

5.6 Dispositivo che fornisce argon ultrapuro

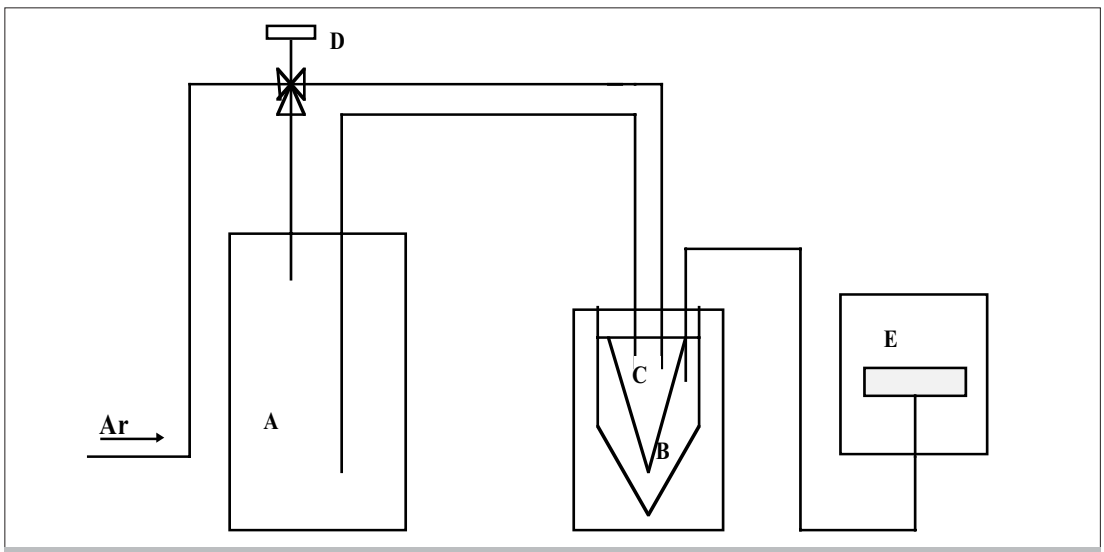


Figura 1: Esempio schematico del sistema degli idruri. A: recipiente del riducente; B: contenitore di reazione; C: cono di immissione del riducente; D: valvola multivie; E: cella di misura.

6. Reattivi

Tutti i reattivi e l'acqua utilizzata per i lavaggi e la preparazione delle soluzioni di riferimento devono essere ad elevato grado di purezza.

6.1 Acido cloridrico concentrato (d=1,19) ad elevato grado di purezza.

6.2 Soluzione di ioduro di potassio al 10%

Sciogliere 10 g di KI in un matraccio di polietilene da 100 mL e portare a volume con acqua.

6.3 Soluzione di $NaBH_4$ al 3% in NaOH all'1%

Sciogliere 10 grammi di NaOH di grado ultrapuro in matraccio di polietilene da 1 litro contenente circa 500 mL di H_2O ed aggiungere gradualmente e sotto agitazione 30 grammi di

$NaBH_4$, quindi portare a volume con acqua. La soluzione così preparata è stabile per circa una settimana se conservata a temperatura non superiore a 4°C.

Nota: il sodio boroidruro libera idrogeno a contatto con acido, dovrà pertanto essere maneggiato con cura e conservato secondo le indicazioni del fornitore.

6.4 Soluzione concentrata di arsenico (1000 mg/L)

Si consiglia di utilizzare soluzioni di riferimento di arsenico ad elevato grado di purezza disponibili in commercio. Le soluzioni per la curva di taratura si ottengono per diluizioni successive della soluzione concentrata (6.4). Preparare almeno tre soluzioni di riferimento nel campo di applicabilità del metodo.

6.5 H_2SO_4 (d=1,84)

6.6 HNO_3 (d=1,40)

6.7 Soluzione di $KMnO_4$ 5% ($\frac{P}{V}$)

6.8 Soluzione di cloridrato di idrossilammina 1,5%

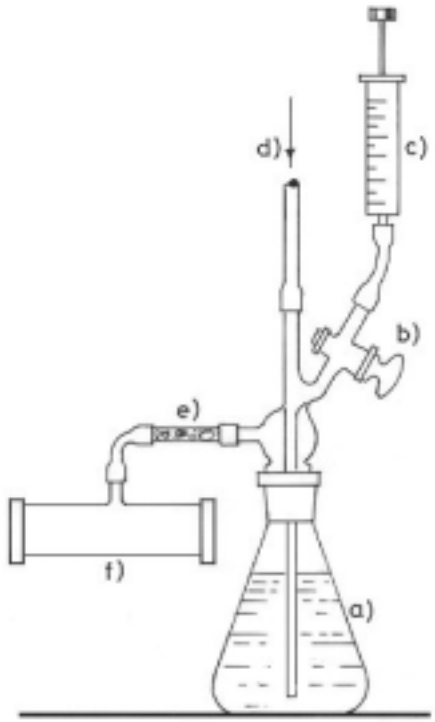


Figura 2: Esempio di generatore per lo sviluppo dell'arsina: a) beuta dove avviene la riduzione; b) rubinetto e tubo di immissione del reattivo; c) siringa di plastica; d) tubo di ingresso dell'argon; e) tubo depuratore contenente acetato di piombo (*); f) cella di misura.
(*) *Soluzione di acetato di piombo* (su lana di vetro). Sciogliere 10 g di acetato di piombo triidrato [$Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$] in 100 mL di acqua.
Questa soluzione viene utilizzata per preparare la lana di vetro all'acetato evitando di impregnarla eccessivamente per impedire che un eccesso di reattivo possa gocciolare nella beuta di reazione.

7. Procedimento

7.1 *Preparazione del campione*

Per determinare l'arsenico totale solubile [As (III) + As (V)] è necessario sottoporre il campione ad una preriduzione con KI in presenza di HCl 4 M. A 10 mL di campione acidificato secondo le modalità precedentemente indicate aggiungere 1 mL di KI (6.2) e lasciar reagire per almeno 1 h a temperatura ambiente. In queste condizioni la forma pentavalente di arsenico viene ridotta a arsenico (III). Il risultato analitico che si ottiene è riferito all'arsenico totale solubile espresso come somma dell'arsenico (III) e dell'arsenico (V).
Qualora l'arsenico debba essere determinato in acque fortemente inquinate con alti contenuti di sostanza organica, prima di operare la riduzione ad arsina è indispensabile una preliminare distruzione della sostanza organica stessa. Allo scopo si può utilizzare una delle seguenti procedure:

Procedura A
Aggiungere a 25 mL di campione 7 mL di acido solforico H_2SO_4 (d=1,84), 5 mL di acido nitrico concentrato (HNO_3) (d=1,40), riscaldare a bagnomaria bollente per 30 minuti ed evaporare fino a fumi bianchi. Occorre mantenere un eccesso di acido nitrico aggiungendo eventualmente altre aliquote di 5 mL finchè tutta la sostanza organica non sia stata distrutta. È necessario controllare se la soluzione imbrunisce. Ove questo avvenga occorre aggiungere altro acido nitrico per evitare la perdita dell'arsenico, a causa della formazione di composti ridotti volatili.
Raffreddare, aggiungere 15 mL di acqua distillata, evaporare fino a comparsa di fumi bianchi per eliminare totalmente gli ossidi di azoto. Raffreddare ed aggiungere cautamente acqua distillata fino al volume iniziale di circa 25 mL.

Procedura B
Aggiungere a 25 mL di campione alcune gocce di soluzione di permanganato di potassio ($KMnO_4$) al 5% p/v, seguite da 2,5 mL di acido solforico concentrato (H_2SO_4) (d=1,84) e da 0,15 mL di acido nitrico concentrato (HNO_3) (d=1,40). Il campione viene posto in bagno termostatico a 35°C per 1 ora e l'eccesso di permanganato viene distrutto aggiungendo, goccia a goccia, una soluzione di cloridrato di idrossilammina ($NH_2OH{\cdot}HCl$) all'1,5% sino a scomparsa della colorazione rosa.

Ovviamente, nel caso in cui venga effettuata la distruzione preliminare della sostanza organica, il bianco dei reattivi dovrà essere misurato operando in modo analogo su un campione di acqua distillata.
La mineralizzazione ossidativa porta tutte le forme del metallo ad As (V), è quindi necessario ridurle poi ad As (III) come descritto in precedenza, aumentando la concentrazione di KI per compensare la eventuale residua presenza degli ossidanti aggiunti.

Se si utilizza il sistema manuale (Fig. 2) porre un'aliquota di 10 mL di campione o delle soluzioni di riferimento nella beuta del generatore (a) e acidificare con HCl concentrato fino ad ottenere una concentrazione 4 M di acido cloridrico. Aggiungere 1 mL di soluzione di ioduro di potassio (6.2). Inserire il tappo smerigliato dopo aver provveduto ad ingrassare leggermente il medesimo.
Far fluire l'argon attraverso il tubo di ingresso (d) (Fig. 2) per un tempo di 30-60 secondi, iniettare in pochi secondi 5 mL di soluzione di sodio boroidruro (6.3) mediante la siringa (c) e chiudere subito il rubinetto (b).

7.2 Ottimizzazione dei parametri strumentali

Per migliorare le prestazioni analitiche dell'apparecchiatura e per minimizzare eventuali interferenze procedere all'ottimizzazione dei parametri strumentali, seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento. In Tabb. 1-2 sono elencate, a titolo di esempio, le condizioni operative tipiche per l'esecuzione delle analisi con il sistema degli idruri.

La fase "purge 1" ha lo scopo di eliminare dal campione composti volatili che possano interferire nella misura; per assicurare una eliminazione completa si può aumentare opportunamente la durata del "purge 1".
Durante la fase di reazione con $NaBH_4$ si forma AsH_3 che viene trasferito mediante un flusso di gas inerte (Ar) nella cella di misura.
La fase "purge 2" consente la pulizia del sistema e la sua preparazione alla lettura del campione successivo.

Tabella 1: Condizioni operative strumentali	
Lunghezza d'onda (nm)	193,7
Fenditura (nm)	0,7
Rilevazione del segnale	altezza o area del picco
Correzione del fondo	attivata
Intensità di corrente della lampada (mA)	come da specifica
Volume del campione (mL)	10
Volume $NaBH_4$ (mL)	4

Tabella 2: Condizioni operative tipiche per l'analisi dell'arsenico con il sistema degli idruri		
Purge 1	30 sec	
Reazione (Riduzione con $NaBH_4$)	10 sec	lettura attivata
Purge 2	30 sec	
temp. cella	1000 °C	

7.3 Analisi

7.3.1 Determinazione diretta

Dopo aver impostato i parametri strumentali, come descritto in (7.2), costruire la curva di taratura utilizzando almeno tre soluzioni di riferimento scelte nel campo di indagine analitico, preparate diluendo opportunamente la soluzione (6.4), e il bianco dei reattivi. Ripetere la misura di ogni soluzione di riferimento compreso il bianco almeno tre volte.
Quindi, eseguire l'analisi dei campioni provenienti dal trattamento descritto in (7.1) effettuando almeno tre letture per ogni soluzione da analizzare; si considerano accettabili i valori che forniscono un coefficiente di variazione inferiore al 10%. Le analisi dei campioni, delle soluzioni di riferimento e del bianco dei reattivi devono essere effettuate nelle stesse condizioni strumentali. Se la risposta del campione incognito analizzato cade al di fuori dell'intervallo di linearità, diluire opportunamente il campione per riportarlo nel campo di linearità. Nel caso in cui sia richiesta l'analisi di un numero notevole di campioni si consiglia di controllare la taratura inserendo ogni cinque campioni una soluzione di controllo utilizzata per la taratura e verificando che il valore di quest'ultima risulti entro il ±5% del valore atteso.

7.3.2 Metodo delle aggiunte note

Il campione proveniente dal trattamento descritto in (7.1) viene suddiviso in quattro aliquote, di cui una rimane tal quale, mentre alle altre si aggiungono concentrazioni crescenti dell'analita dello stesso ordine di grandezza di quella attesa per il campione. Misurare l'assorbanza delle quattro soluzioni e del bianco dei reattivi, seguendo le indicazioni riportate in 7.2 avendo cura di ripetere le misure almeno tre volte. La concentrazione totale di arsenico presente nelle aliquote non deve superare il valore limite oltre il quale la risposta strumentale non è più lineare.

8. Calcoli

8.1 Determinazione diretta

La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le concentrazioni (μg/L) delle soluzioni di riferimento in ascissa e le assorbanze corrispondenti, corrette del bianco, in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%. Calcolare quindi la concentrazione di arsenico nel campione utilizzando l'equazione ottenuta dalla regressione lineare, tenendo conto dell'eventuale diluizione effettuata.

8.2 Metodo delle aggiunte

Siano C_1, C_2, C_3, rispettivamente le concentrazioni corrispondenti alla 1ª, 2ª, 3ª aggiunta e A_0, A_1, A_2, A_3, le assorbanze del campione (A_0) e del campione addizionato delle varie aggiunte, sottratte del bianco dei reattivi. Calcolare la retta di regressione che interpola i valori di assorbanza in funzione delle concentrazioni aggiunte, attribuendo al campione incognito di assorbanza A_0 una concentrazione "aggiunta" uguale a zero. La concentrazione incognita riferita al campione sarà data dal valore dell'intercetta sull'asse (x) cambiato di segno. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%.

9. Qualità del dato

Prove effettuate (n=5) da tre laboratori, su soluzioni sintetiche di acqua deionizzata, in tutto il campo di applicazione indicato, hanno fornito valori del coefficiente di variazione, CV(%) = (scarto tipo/valore medio)·100, inferiori al 10%. Va tenuto presente che la precisione di un metodo generalmente peggiora all'aumentare della complessità della matrice.

Nota: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".*
Caratterizzato il materiale di riferimento non certificato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, è possibile verificare gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

APPENDICE

Raccomandazioni sull'uso in sicurezza di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico con generatore di idruri

I vapori di arsenico (arsina) prodotti a seguito della reazione con sodio boroidruro sono altamente tossici e rappresentano, se inalati, un serio pericolo per l'operatore. Si consiglia pertanto di procedere ad un intrappolamento di tali vapori. Ciò si realizza attraverso un sistema a circolazione chiusa come quello riportato in Fig. 3. I vapori di arsenico vengono trasportati mediante un flusso di gas inerte (Ar) attraverso il tubo (d) nella cella di misura (A), chiusa all'estremità da finestre (f) costituite di materiale trasparente a 193,7 nm. Successivamente vengono convogliati tramite i tubi di collegamento (e) prima in una trappola di essiccazione (B) e poi in una trappola (C) contenente un filtro a carbone attivo che trattiene l'arsenico. L'uscita della trappola a carbone attivo (g) è collegata, tramite un tubo, ad una cappa aspirante provvista anch'essa di filtro a carbone attivo. Il carbone attivo deve essere sostituito periodicamente e sottoposto a smaltimento nel rispetto delle normative vigenti.

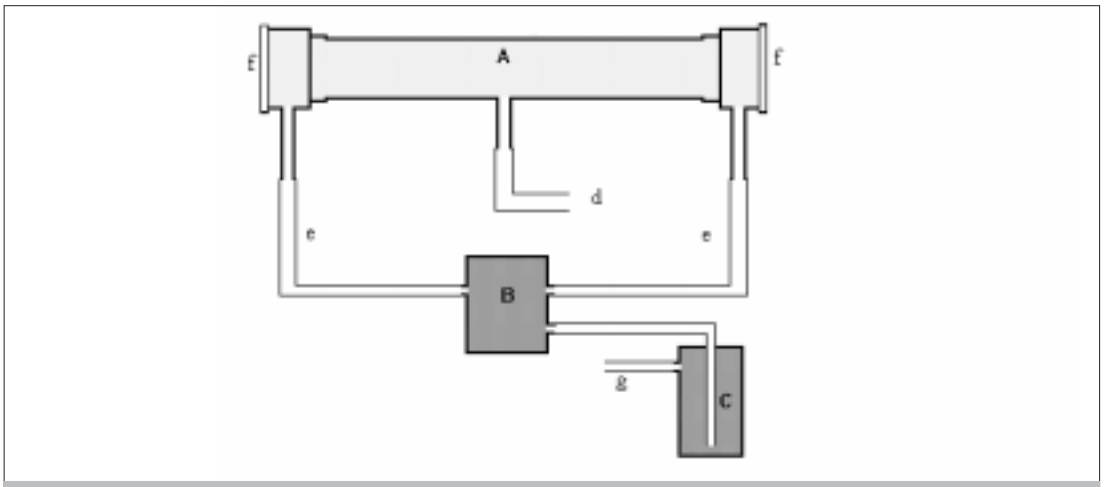


Figura 3: Descrizione schematica del sistema a circolazione chiusa utilizzato per intrappolare i vapori di arsenico.

METODO B - Determinazione spettrofotometrica con dietilditiocarbammato di argento

1. Principio del metodo

Il metodo si basa sullo sviluppo dell'arsina e sulla sua successiva reazione con dietilditiocarbammato di argento (AgDDC) e morfolina in cloroformio. L'arsina reagisce con AgDDC dando un composto rosso con massimo di assorbanza a 535 nm.

2. Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione dell'arsenico nelle acque naturali e di scarico a concentrazioni comprese fra 0,04 e 0,6 mg/L.
Effettuando 10 determinazioni su uno stesso campione avente un contenuto di arsenico pari a 0,04 mg/L, si è potuto calcolare un limite di rivelabilità, espresso come tre volte lo scarto tipo, di 0,008 mg/L.

3. Interferenze e cause di errore

Per quanto concerne le acque naturali non si hanno interferenze significative.
Nel caso di acque di scarico occorre tenere presente che molti metalli (Cr, Co, Cu, Hg, Mo, Ni, Ag, Se) impediscono rese quantitative nello sviluppo dell'arsina, a livelli di concentrazione superiori di 100 volte in peso rispetto all'arsenico presente.
L'interferenza più consistente è data dall'antimonio che nelle stesse condizioni sviluppa stibina capace di dare con il dietilditiocarbammato di argento un composto rosso con massimo di assorbimento a 510 nm; sino a rapporti in peso Sb:As di 15:1 l'interferenza positiva si mantiene al di sotto del 10%.
L'idrogeno solforato ed i solfuri interferiscono, ma il metodo prevede la loro eliminazione mediante acetato di piombo [vedi tubo (e) di Fig. 2, metodo A].

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione debbono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento" e come prescritto al Capitolo 4 del metodo A.
L'analisi deve essere effettuate prima possibile e comunque il campione acidificato con HCl (1+1) è conservabile per lungo tempo.

5. Apparecchiature

5.1 Generatore per lo sviluppo dell'arsina

Si può far riferimento al dispositivo descritto in Fig. 2 del metodo A, tenendo presente che in questo caso il tubo depuratore (e), riempito con acetato di piombo, è collegato ad un cilindro graduato di raccolta contenente la soluzione assorbente di dietilditiocarbammato di argento e morfolina in cloroformio e non alla cella di misura dello spettrofotometro di assorbimento atomico.

5.2 Spettrofotometro adatto per misure alla lunghezza d'onda di 535 nm, dotato di celle con cammino ottico di 1 cm.

5.3 Dispositivo che fornisce argon ultrapuro

6. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi. Per la preparazione delle soluzioni deve essere usata acqua distillata e/o deionizzata.

6.1 Acido cloridrico concentrato (HCl) (d=1,18)

6.2 Soluzione di acetato di piombo (su lana di vetro).

Sciogliere 10 g di acetato di piombo triidrato [$Pb(CH_3COO)_2 \cdot 3H_2O$) in 100 mL di acqua.
Questa soluzione viene utilizzata per preparare la lana di vetro all'acetato evitando di impregnarla eccessivamente per impedire che un eccesso di reattivo possa gocciolare nella beuta di reazione.

6.3 Reattivo al dietilditiocarbammato di argento

Sciogliere 10 mL di morfolina in 70 mL di cloroformio. Aggiungere 0,3 g di dietilditiocarbammato d'argento [$AgSCSN(C_2H_5)_2$]. Agitare fino a quasi completa dissoluzione e portare a volume a 100 mL con cloroformio. Conservata in bottiglia scura e al riparo dalla luce la soluzione è stabile per un mese.

6.4 Soluzione di $NaBH_4$ al 3% in NaOH all'1%

Sciogliere 10 grammi di NaOH di grado ultrapuro in matraccio di polietilene da 1 litro contenente circa 500 mL di H_2O ed aggiungere gradualmente e sotto agitazione 30 grammi di $NaBH_4$, quindi portare a volume con acqua. La soluzione così preparata è stabile per circa una settimana se conservata a temperatura non superiore a 4°C.

6.5 Soluzione di ioduro di potassio al 10%

Sciogliere 10 g di ioduro di potassio (KI) in un matraccio di polietilene da 100 mL e portare a volume con acqua.

6.6 Soluzione concentrata di arsenico (1000 mg/L)

Si consiglia di utilizzare soluzioni di riferimento di arsenico ad elevato grado di purezza disponibili in commercio. Le soluzioni per la curva di taratura si ottengono per diluizioni successive della soluzione concentrata (6.6). Preparare almeno tre soluzioni di riferimento nel campo di applicabilità del metodo.

7. Procedimento

7.1 Preparazione del campione

Seguire le modalità operative descritte al Paragrafo 7.1 del metodo A per quanto riguarda la preriduzione con ioduro di potassio e l'eventuale distruzione della sostanza organica.
Utilizzare, quindi, il dispositivo (5.1) e operare la riduzione ad arsina con sodio boroidruro (6.4). Far fluire l'argon attraverso il tubo di ingresso (d) e iniettare, possibilmente con regolarità per la durata di 3 minuti, 5 mL di soluzione di sodio boroidruro (6.4) mediante la siringa (c). Chiudere subito il rubinetto (b) ed attendere 15 minuti. Raccogliere l'arsina nella soluzione di dietilditiocarbammato d'argento (4 mL).

7.2 Taratura e analisi

Costruire la curva di taratura utilizzando almeno tre soluzioni di riferimento scelte nel campo di indagine analitico, preparate diluendo opportunamente la soluzione (6.6), e il bianco dei reattivi.
Quindi, eseguire l'analisi dei campioni provenienti dal trattamento descritto in (7.1) effettuando almeno tre repliche per ogni soluzione da analizzare; si considerano accettabili i valori delle repliche che forniscono un coefficiente di variazione inferiore al 10%.
Se la risposta del campione incognito analizzato cade al di fuori dell'intervallo di linearità, diluire opportunamente il campione per riportarlo nel campo di linearità.

8. Calcoli

La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le quantità di As (µg) delle soluzioni di riferimento in ascissa e le assorbanze corrispondenti, corrette del bianco, in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%. Calcolare quindi la concentrazione di arsenico nel campione in $mg \cdot L^{-1}$ utilizzando la seguente equazione:

$$C = \frac{a}{V}$$

dove:
a = quantità (µg) di arsenico ricavata dalla curva di taratura;
V = volume (mL) di campione introdotto nel generatore di arsina.

9. Qualità del dato

Prove effettuate (n=7) da un solo laboratorio su soluzioni sintetiche di acqua deionizzata contenenti 0,04 mg/L hanno fornito un valore del coefficiente di variazione, [CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100], pari al 14%. Va tenuto presente che la precisione generalmente peggiora all'aumentare della complessità della matrice.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA), 3-32/3-36, 3-59/3-61.

CREMISINI C., DALL'AGLIO M. & GHIARA E. (1979): "Arsenic in Italian rivers and in some cold and thermal springs", *International Conference Management and Control of Heavy Metals in the Environment* (London).

IRSA (1986 a): "I metalli nelle acque: origine, distribuzione, metodi di rimozione", Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **71**, 17-20.

IRSA (1986 b): "Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **75**, 244-252.

3090. Bario

Il bario ha una concentrazione media di 430 ppm nella crosta terrestre. In natura è presente prevalentemente come barite ($BaSO_4$) e whiterite ($BaCO_3$). Viene utilizzato principalmente nell'industria dei pigmenti, sotto forma di barite bianca; altri utilizzi in metallurgia, in medicina, nell'industria del vetro, della ceramica, dei coloranti e degli esplosivi.
Nelle acque naturali è presente solo come Ba (II), in genere sotto forma di Ba^{2+} e, anche se non ha una particolare tendenza ad adsorbirsi su sostanze solide, la sua mobilità geochimica è drasticamente limitata dalla elevata insolubilità dei suoi sali carbonato e, soprattutto, solfato.
Concentrazioni comprese tra 5 e 100 µg/L vengono riportate come valori di riferimento per acque fluviali e marine. Non vengono forniti per il bario criteri di qualità specifici ai fini della protezione della vita acquatica, mentre viene indicato un livello di 100 µg/L di Ba per acque destinate a potabilizzazione.
Il D.Lgs. 152/99 in materia di tutela delle acque dall'inquinamento prevede criteri di qualità diversificati (0,1-1 mg/L), in funzione dei trattamenti chimico-fisici previsti, per le acque superficiali destinate alla potabilizzazione.

METODO A - Determinazione per spettrometria di assorbimento atomico con atomizzazione in fiamma (F-AAS)

1. Principio del metodo

Il bario viene determinato per aspirazione diretta del campione nella fiamma (protossido di azoto-acetilene) di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico. Dalla misura del segnale di assorbanza a 553,6 nm si ricava la concentrazione mediante confronto con una curva di taratura ottenuta con soluzioni a concentrazioni note di analita, comprese nel campo di indagine analitico.

2. Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione del bario in campioni di acque naturali e di scarico nell'intervallo di concentrazione da 1,0 a 20 mg/L. Per concentrazioni superiori a 20 mg/L è possibile rientrare nell'intervallo indicato ricorrendo alla diluizione del campione oppure facendo ricorso ad una lunghezza d'onda meno sensibile, prendendo come riferimento quelle generalmente consigliate dal manuale d'uso fornito a corredo dell'apparecchiatura.
Effettuando 10 determinazioni su uno stesso campione avente un contenuto di bario pari a 1,0 mg/L, alternate con una misura del bianco, si è potuto calcolare un limite di rivelabilità, espresso come tre volte lo scarto tipo, di 0,1 mg/L.

3. Interferenze e cause di errore

L'utilizzo del correttore di fondo consente di minimizzare gli assorbimenti aspecifici eventualmente presenti. Nel caso in cui si debba determinare l'analita in una matrice sconosciuta o scarsamente caratterizzata è consigliabile ricorrere al metodo delle aggiunte note. Tale meto-

do permette di minimizzare le interferenze di matrice di tipo fisico e/o chimico (variazioni di densità, viscosità, tensione superficiale) eventualmente presenti.
L'aggiunta di sali di lantanio allo 0,1% consente di eliminare le interferenze da ionizzazione.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". Si consiglia di conservare i campioni in bottiglie di polipropilene, o altro materiale caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli, precedentemente trattate con HNO_3 1 M per una notte e successivamente neutralizzate con acqua ad elevato grado di purezza. Per determinare soltanto il bario disciolto, il campione viene filtrato dopo il prelievo su membrana da 0,45 µm (acetato di cellulosa o policarbonato) e acidificato fino a pH<2 con HNO_3 (6.1). L'analisi deve essere effettuata prima possibile e comunque il campione acidificato rimane stabile per almeno una settimana dal prelievo. Per la determinazione quantitativa del bario totale si rimanda alle Sezioni 3000 e 3010.

5. Apparecchiature

5.1 Spettrofotometro di assorbimento atomico, corredato di bruciatore standard per protossido di azoto-acetilene e di dispositivo per la correzione degli assorbimenti aspecifici.

5.2 Lampada a catodo cavo o altra sorgente luminosa capace di emettere lo spettro dell'elemento in esame.

6. Reattivi

Tutti i reattivi e l'acqua utilizzata per i lavaggi e la preparazione delle soluzioni di riferimento devono essere ad elevato grado di purezza.

6.1 Acido nitrico concentrato (d=1,40)

6.2 Soluzione di lantanio (1% La)

6.3 Soluzione concentrata di bario (1000 mg/L)

Si consiglia di utilizzare soluzioni di riferimento ad elevato grado di purezza disponibili in commercio.

6.4 Soluzione diluita di bario (100 mg/L)

Trasferire 10 mL della soluzione (6.3) in pallone tarato da 100 mL, aggiungere 1 mL di HNO_3 (6.1) e portare a volume con acqua ad elevato grado di purezza. Questa soluzione è stabile per almeno un mese se conservata a 4°C in un contenitore caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli (polietilene o policarbonato) e opportunamente chiuso in modo da evitare sia l'evaporazione del solvente che eventuali contaminazioni.

7. Procedimento

7.1 Ottimizzazione dei parametri strumentali

Per migliorare le prestazioni analitiche dell'apparecchiatura e per minimizzare eventuali in-

terferenze, procedere all'ottimizzazione dei parametri strumentali seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento o in altri protocolli standardizzati. In Tab. 1 sono elencate, a titolo di esempio, le condizioni operative tipiche per l'esecuzione delle analisi.

Tabella 1: Condizioni operative strumentali	
Lunghezza d'onda (nm)	553,6
Fenditura (nm)	0,2
Correzione del fondo	attivata se possibile
Fiamma	protossido di azoto-acetilene
Intensità di corrente della lampada (mA)	come da specifica

7.2 Analisi

7.2.1 Determinazione diretta

Dopo aver impostato i parametri strumentali come descritto in (7.1), costruire la curva di taratura utilizzando almeno tre soluzioni di riferimento preparate diluendo opportunamente la soluzione (6.4), in modo tale da coprire l'intero campo di indagine analitico, e il bianco dei reattivi. Ripetere la misura di ogni soluzione di riferimento compreso il bianco almeno tre volte.
Quindi, eseguire l'analisi dei campioni effettuando almeno tre letture per ogni soluzione da analizzare; si considerano accettabili i valori che forniscono un coefficiente di variazione inferiore al 5%. Le analisi dei campioni, delle soluzioni di riferimento e del bianco dei reattivi devono essere effettuate nelle stesse condizioni strumentali. Se la risposta del campione incognito analizzato cade al di fuori dell'intervallo di linearità diluire opportunamente il campione per riportarlo nel campo di linearità. Qualora risulti necessaria una diluizione del campione talmente elevata da esaltare gli errori connessi alla suddetta operazione è preferibile ripetere sia la taratura che l'analisi ricorrendo ad un'altra riga analitica meno sensibile.
Nel caso in cui sia richiesta l'analisi di un numero notevole di campioni si consiglia di controllare la taratura inserendo ogni cinque campioni una soluzione di controllo utilizzata per la taratura e verificando che il valore di quest'ultima risulti entro il ±5% del valore atteso.

7.2.2 Metodo delle aggiunte note

Il campione viene suddiviso in quattro aliquote, di cui una rimane tal quale, mentre alle altre si aggiungono concentrazioni crescenti dell'analita dello stesso ordine di grandezza di quella attesa per il campione. Misurare l'assorbanza delle quattro soluzioni e del bianco dei reattivi seguendo le indicazioni riportate al Paragrafo 7.1, avendo cura di ripetere le misure almeno tre volte. La concentrazione totale di bario presente nelle aliquote deve comunque essere inferiore al valore limite oltre il quale la risposta strumentale non è più lineare.

8. Calcoli

8.1 Determinazione diretta

La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le concentrazioni (mg/L) delle soluzioni di riferimento in ascissa e le assorbanze corrispondenti, corrette del bianco, in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%. Calcolare quindi la concentrazione del bario nel campione utilizzando l'equazione ottenuta dalla regressione lineare, tenendo conto dell'eventuale diluizione effettuata.

8.2 Metodo delle aggiunte

Siano C_1, C_2, C_3, rispettivamente le concentrazioni corrispondenti alla 1ª, 2ª, 3ª aggiunta e A_0,

A_1, A_2, A_3, le assorbanze del campione (A_0) e del campione addizionato delle varie aggiunte, sottratte del bianco dei reattivi. Calcolare la retta di regressione che interpola i valori di assorbanza in funzione delle concentrazioni aggiunte, attribuendo al campione incognito di assorbanza A_0 una concentrazione "aggiunta" uguale a zero. La concentrazione incognita riferita al campione sarà data dal valore dell'intercetta sull'asse (x) cambiato di segno. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%.

9. Qualità del dato

Prove effettuate in quintuplicato da tre laboratori su campioni di acque esenti da solfati, dopo aggiunta di quantità note di bario in modo da ottenere una concentrazione di 20 mg/L, hanno fornito i seguenti risultati:

Concentrazione attesa (mg/L)	20,0
Concentrazione trovata (mg/L)*	19,9 ± 0,4
CV (%) interlaboratorio	2,0
Accuratezza (%)**	0,5

** valor medio ± scarto tipo*
CV (%) = coefficiente di variazione; CV (%) = (scarto tipo/valore medio)•100
*** Non essendo stati utilizzati materiali di riferimento, l'accuratezza va intesa come grado di accordo tra il risultato della misurazione e il valore di riferimento accettato.*

Per acque di scarico, dopo aggiunta di quantità note di bario tali da realizzare una concentrazione finale di 1 mg/L, lo Standard Methods riporta una riproducibilità dell'8,9% ed un'accuratezza del 2,7%.

Nota: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".*
Caratterizzato il materiale di riferimento non certificato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, è possibile verificare gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

METODO B - Determinazione per spettrometria di assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica (ETA-AAS)

1. Principio del metodo

Il bario viene determinato per iniezione diretta del campione nel fornetto di grafite di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico. Dalla misura del segnale di assorbanza a 553,6 nm si ricava la concentrazione mediante confronto con una curva di taratura ottenuta con soluzioni a concentrazioni note di analita, comprese nel campo di indagine analitico.

2. Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione del bario in campioni di acque naturali e di scarico nell'intervallo di concentrazione da 4,0 a 40 µg/L. Per concentrazioni superiori a 40 µg/L è possibile rientrare nell'intervallo indicato ricorrendo alla diluizione del campione.
Effettuando 10 determinazioni su uno stesso campione avente un contenuto di bario pari a 4,0 µg/L, alternate con una misura del bianco, si è potuto calcolare un limite di rivelabilità, espresso come tre volte lo scarto tipo, di 0,5 µg/L (volume di campione iniettato: 25 µL). Tale limite dipende dalla matrice e dalle condizioni strumentali applicate; può essere leggermente migliorato aumentando il volume di campione iniettato. Tuttavia applicando queste modalità vengono esaltati gli effetti delle specie interferenti.

3. Interferenze e cause di errore

L'utilizzo del correttore di fondo consente di minimizzare gli assorbimenti aspecifici eventualmente presenti. Nel caso in cui si debba determinare l'analita in una matrice sconosciuta o scarsamente caratterizzata è consigliabile ricorrere al metodo delle aggiunte note. Tale metodo permette di minimizzare le interferenze di tipo fisico e/o chimico eventualmente presenti.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". In particolare, considerando le basse concentrazioni da determinare, si consiglia di conservare i campioni in bottiglie di polipropilene o altro materiale caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli, precedentemente trattate con HNO_3 1 M per una notte e successivamente neutralizzate con acqua ad elevato grado di purezza. Per determinare soltanto il bario disciolto, il campione viene filtrato dopo il prelievo su membrana da 0,45 µm (acetato di cellulosa o policarbonato) e acidificato fino a pH<2 con HNO_3 (6.1). L'analisi deve essere effettuata prima possibile e comunque il campione acidificato rimane stabile per almeno una settimana dal prelievo. Per la determinazione quantitativa del bario totale si rimanda alle Sezioni 3000 e 3010.
È buona norma considerare sempre l'opportunità di predisporre un "bianco di campo", ottenuto semplicemente mediante lo stoccaggio di un'aliquota di acqua ultrapura in un recipiente identico a quello dei prelievi, da sottoporre successivamente a tutte le fasi analitiche previste per i campioni. Altri sistemi di controllo della qualità del campionamento consistono nell'uso di campioni replicati, nell'attivazione di precauzioni per proteggere i campioni in modo da evitare qualsiasi possibile contaminazione, nell'avvinamento regolare dei recipienti.

5 . Apparecchiature

5.1 *Spettrofotometro di assorbimento atomico,* corredato di fornetto di grafite e di dispositivo per la correzione degli assorbimenti aspecifici.

5.2 *Lampada a catodo cavo* o altra sorgente luminosa capace di emettere lo spettro dell'elemento in esame.

5.3 *Autocampionatore* oppure micropipette tarate per il dosaggio di pochi µL.

5.4 *Dispositivo per la registrazione dell'assorbanza*, adatto ad evidenziare la forma del picco.

5.5 Dispositivo che fornisce argon ultrapuro

6. Reattivi

Tutti i reattivi e l'acqua utilizzata per i lavaggi e la preparazione delle soluzioni di riferimento devono essere ad elevato grado di purezza.

6.1 Acido nitrico concentrato (d=1,40)

6.2 Soluzione concentrata di bario (1000 mg/L)

Si consiglia di utilizzare soluzioni di riferimento ad elevato grado di purezza disponibili in commercio.

6.3 Soluzione diluita di bario (2,0 mg/L)

Trasferire 200 µL della soluzione (6.2) in pallone tarato da 100 mL, aggiungere 1 mL di HNO_3 (6.1) e portare a volume con acqua ad elevato grado di purezza. Questa soluzione è stabile per almeno un mese se conservata a 4°C in un contenitore caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli (polietilene o policarbonato) e opportunamente chiuso in modo da evitare sia l'evaporazione del solvente che eventuali contaminazioni.

7. Procedimento

7.1 Ottimizzazione dei parametri strumentali

Per migliorare le prestazioni analitiche dell'apparecchiatura e per minimizzare eventuali interferenze, procedere all'ottimizzazione dei parametri strumentali seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento o in altri protocolli standardizzati. In Tabb. 1-2 sono elencate, a titolo di esempio, le condizioni operative tipiche per l'esecuzione delle analisi.

Tabella 1: Condizioni operative strumentali

Lunghezza d'onda (nm)	553,6
Fenditura (nm)	0,4
Rilevazione del segnale	altezza o area del picco
Correzione del fondo	attivata
Tubo	pirolitico
Intensità di corrente della lampada (mA)	come da specifica
Volume del campione (µL)	25

Tabella 2: Programma termico

	T°C	RT	HT	G	R
Essiccamento	120	20	20	300	
Incenerimento	1200	40	20	300	
Atomizzazione	2600	0	5	0	*
Pulizia	2700	1	5	300	

RT = tempo in secondi della rampa di temperatura
HT = tempo in secondi di permanenza alla temperatura impostata (isoterma)
T°C = temperatura impostata in °C
G = flusso del gas di lavaggio (argon ultrapuro) in mL/minuto
R = attivazione della lettura in atomizzazione.

Il ciclo elettrotermico riportato è valido nel caso in cui si utilizzi un tubo di grafite pirolitica; in tutti gli altri casi andrà ottimizzato, prendendo come riferimento quello generalmente consigliato dal manuale d'uso fornito a corredo dell'apparecchiatura.

7.2 Analisi

7.2.1 Determinazione diretta

Dopo aver impostato i parametri strumentali come descritto in (7.1), costruire la curva di taratura utilizzando almeno tre soluzioni di riferimento scelte nel campo di indagine analitico, preparate diluendo opportunamente la soluzione (6.3), e il bianco dei reattivi. Ripetere la misura di ogni soluzione di riferimento compreso il bianco almeno tre volte.
Quindi, eseguire l'analisi dei campioni effettuando almeno tre letture per ogni soluzione da analizzare; si considerano accettabili i valori che forniscono un coefficiente di variazione inferiore al 10%. Le analisi dei campioni, delle soluzioni di riferimento e del bianco dei reattivi devono essere effettuate nelle stesse condizioni strumentali. Se la risposta del campione incognito analizzato cade al di fuori dell'intervallo di linearità, diluire opportunamente il campione per riportarlo nel campo di linearità. Qualora risulti necessaria una diluizione del campione talmente elevata da esaltare gli errori connessi alla suddetta operazione è preferibile ripetere sia la taratura che l'analisi riducendo la quantità di campione iniettato nel fornetto di grafite oppure aumentando il flusso di gas di lavaggio in atomizzazione.
Nel caso in cui sia richiesta l'analisi di un numero notevole di campioni si consiglia di controllare la taratura inserendo ogni cinque campioni una soluzione di controllo utilizzata per la taratura e verificando che il valore di quest'ultima risulti entro il ±5% del valore atteso.

7.2.2 Metodo delle aggiunte note

Il campione viene suddiviso in quattro aliquote, di cui una rimane tal quale, mentre alle altre si aggiungono concentrazioni crescenti dell'analita dello stesso ordine di grandezza di quella attesa per il campione. Misurare l'assorbanza delle quattro soluzioni e del bianco dei reattivi seguendo le indicazioni riportate al Paragrafo 7.1, avendo cura di ripetere le misure almeno tre volte. La concentrazione totale di bario presente nelle aliquote non deve superare il valore limite oltre il quale la risposta strumentale non è più lineare.

8. Calcoli

8.1 Determinazione diretta

La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le concentrazioni (μg/L) delle soluzioni di riferimento in ascissa e le assorbanze corrispondenti, corrette del bianco, in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%. Calcolare quindi la concentrazione del bario nel campione utilizzando l'equazione ottenuta dalla regressione lineare, tenendo conto dell'eventuale diluizione effettuata.

8.2 Metodo delle aggiunte

Siano C_1, C_2, C_3, rispettivamente le concentrazioni corrispondenti alla 1ª, 2ª, 3ª aggiunta e A_0, A_1, A_2, A_3, le assorbanze del campione (A_0) e del campione addizionato delle varie aggiunte, sottratte del bianco dei reattivi. Calcolare la retta di regressione che interpola i valori di assorbanza in funzione delle concentrazioni aggiunte, attribuendo al campione incognito di assorbanza A_0 una concentrazione "aggiunta" uguale a zero. La concentrazione incognita riferita al campione sarà data dal valore dell'intercetta sull'asse (x) cambiato di segno. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%.

9. Qualità del dato

Prove effettuate (n=6) da un solo laboratorio su soluzioni sintetiche di acqua deionizzata contenenti 25 µg/L di bario hanno fornito un valore del coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100, pari al 3% ed un'accuratezza dell'11%. Non essendo stati utilizzati materiali di riferimento, l'accuratezza va intesa come grado di accordo tra il risultato della misurazione e il valore di riferimento accettato.
Va tenuto presente che la precisione e accuratezza di un metodo generalmente peggiorano all'aumentare della complessità della matrice.
Su campioni di acque di scarico, ad una concentrazione di 56,5 µg/L di bario lo Standard Methods riporta una riproducibilità del 43% ed un'accuratezza del 59%.

Nota: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".*
Caratterizzato il materiale di riferimento non certificato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, è possibile verificare gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA), 3-12/3-31.

IRSA (1986 a): "I metalli nelle acque: origine, distribuzione, metodi di rimozione", Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **71**, 21-22.

IRSA (1986 b): "Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **75**, 263-278.

UNICHIM (1995): "*Linee Guida per la taratura della strumentazione analitica - Spettrometri di assorbimento atomico a fiamma (FAAS)*", Manuale 177/1, Milano.

UNICHIM (1996): "*Linee Guida per la taratura della strumentazione analitica – Spettrometri di assorbimento atomico ad atomizzazione elettrotermica (EAAS)*", Manuale 177/2, Milano.

3100. Berillio

Il berillio è considerato elemento raro; la sua abbondanza nella crosta terrestre è pari soltanto a 0,07 mg/kg, simile a quella dell'argento. Il berillio e le leghe che lo contengono sono largamente utilizzate nell'industria, ma la fonte antropogenica principale è probabilmente costituita dalla combustione del carbone, dove è presente in concentrazioni di 0,4-8 mg/kg.
Nelle acque dolci è raramente presente in concentrazioni sufficientemente elevate da manifestare effetti tossici; il cloruro e il nitrato sono molto solubili, il solfato è moderatamente solubile, mentre praticamente insolubili sono il carbonato e l'idrossido. Nelle acque di mare la forma teorica prevista è il $BeOH^+$.
Per acque dolci e marine incontaminate viene indicata una concentrazione di riferimento di 0,0002 µg/L. Non sono stati fissati criteri di qualità per la protezione della vita acquatica e il consumo umano per il berillio solubile, nè da parte dei paesi europei né da parte dell'EPA. Il D.Lgs. 152/99 in materia di tutela delle acque dall'inquinamento prevede un criterio di qualità di 4 µg/L per le acque sotterranee.

METODO A - Determinazione per spettrometria di assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica (ETA-AAS)

1. Principio del metodo

Il berillio viene determinato per iniezione diretta del campione nel fornetto di grafite di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico. Dalla misura del segnale di assorbanza a 234,9 nm si ricava la concentrazione mediante confronto con una curva di taratura ottenuta con soluzioni a concentrazioni note di analita, comprese nel campo di indagine analitico.

2. Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione del berillio in campioni di acque naturali e di scarico nell'intervallo di concentrazione da 0,5 a 4,0 µg/L. Per concentrazioni superiori a 4 µg/L è possibile rientrare nell'intervallo indicato ricorrendo alla diluizione del campione.
Effettuando 10 determinazioni su uno stesso campione avente un contenuto di berillio pari a 0,5 µg/L, alternate con una misura del bianco, si è potuto calcolare un limite di rivelabilità, espresso come tre volte lo scarto tipo, di 0,1 µg/L (volume iniettato: 25 µL di campione e 25 µL di modificante). Tale limite dipende dalla matrice e dalle condizioni strumentali applicate; può essere leggermente migliorato aumentando il volume di campione iniettato. Tuttavia applicando queste modalità vengono esaltati gli effetti delle specie interferenti.

3. Interferenze e cause di errore

L'utilizzo del correttore di fondo consente di minimizzare gli assorbimenti aspecifici eventualmente presenti. Nel caso in cui si debba determinare l'analita in una matrice sconosciuta o scarsamente caratterizzata è consigliabile ricorrere al metodo delle aggiunte note. Tale metodo permette di minimizzare le interferenze di tipo fisico e/o chimico eventualmente presenti. Il ricorso ad un idoneo modificatore consente di rendere la matrice più volatile o di formare

composti più stabili con l'elemento in esame; mediante un opportuno ciclo elettrotermico è possibile allontanare la matrice senza perdere l'analita di interesse.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". In particolare, considerando le basse concentrazioni da determinare, si consiglia di conservare i campioni in bottiglie di polipropilene o altro materiale caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli, precedentemente trattate con HNO_3 1 M per una notte e successivamente neutralizzate con acqua ad elevato grado di purezza. Per determinare soltanto il berillio disciolto, il campione viene filtrato dopo il prelievo su membrana da 0,45 µm (acetato di cellulosa o policarbonato) e acidificato fino a pH<2 con HNO_3 (6.1). L'analisi deve essere effettuata prima possibile e comunque il campione acidificato rimane stabile per almeno una settimana dal prelievo. Per la determinazione quantitativa del berillio totale si rimanda alle Sezioni 3000 e 3010.
È buona norma considerare sempre l'opportunità di predisporre un "bianco di campo", ottenuto semplicemente mediante lo stoccaggio di un'aliquota di acqua ultrapura in un recipiente identico a quello dei prelievi, da sottoporre successivamente a tutte le fasi analitiche previste per i campioni. Altri sistemi di controllo della qualità del campionamento consistono nell'uso di campioni replicati, nell'attivazione di precauzioni per proteggere i campioni in modo da evitare qualsiasi possibile contaminazione, nell'avvinamento regolare dei recipienti.

5. Apparecchiature

5.1 Spettrofotometro di assorbimento atomico, corredato di fornetto di grafite e di dispositivo per la correzione degli assorbimenti aspecifici.

5.2 Lampada a catodo cavo o altra sorgente luminosa capace di emettere lo spettro dell'elemento in esame.

5.3 Autocampionatore oppure micropipette tarate per il dosaggio di pochi µL.

5.4 Dispositivo per la registrazione dell'assorbanza, adatto ad evidenziare la forma del picco.

5.5 Dispositivo che fornisce argon ultrapuro

6. Reattivi

Tutti i reattivi e l'acqua utilizzata per i lavaggi e la preparazione delle soluzioni di riferimento devono essere ad elevato grado di purezza.

6.1 Acido nitrico concentrato (d=1,40)

6.2 Soluzione concentrata di berillio (1000 mg/L)

Si consiglia di utilizzare soluzioni di riferimento ad elevato grado di purezza disponibili in commercio.

6.3 Soluzione diluita di berillio (2,0 mg/L)

Trasferire 200 µL della soluzione (6.2) in pallone tarato da 100 mL, aggiungere 1 mL di HNO_3

(6.1) e portare a volume con acqua ad elevato grado di purezza. Questa soluzione è stabile per almeno un mese se conservata a 4°C in un contenitore caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli (polietilene o policarbonato) e opportunamente chiuso in modo da evitare sia l'evaporazione del solvente che eventuali contaminazioni.

6.4 Modificatore di matrice $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$

Sciogliere 0,3455 g di $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ di grado ultrapuro in acqua deionizzata e portare a volume in matraccio tarato da 100 mL in polietilene. È possibile utilizzare anche altri modificatori seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento.

7. Procedimento

7.1 Ottimizzazione dei parametri strumentali

Per migliorare le prestazioni analitiche dell'apparecchiatura e per minimizzare eventuali interferenze, procedere all'ottimizzazione dei parametri strumentali seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento o in altri protocolli standardizzati. In Tabb. 1-2 sono elencate, a titolo di esempio, le condizioni operative tipiche per l'esecuzione delle analisi.

Tabella 1: Condizioni operative strumentali

Lunghezza d'onda (nm)	234,9
Fenditura (nm)	0,7
Rilevazione del segnale	altezza o area del picco
Correzione del fondo	attivata
Tubo	pirolitico
Intensità di corrente della lampada (mA)	come da specifica
Volume del campione (µL)	25
Volume del modificante di matrice (µL)	25

Tabella 2: Programma termico

	T°C	RT	HT	G	R
Essiccamento	120	20	20	300	
Incenerimento	1500	40	20	300	
Atomizzazione	2400	0	5	0	*
Pulizia	2600	1	5	300	

RT = tempo in secondi della rampa di temperatura
HT = tempo in secondi di permanenza alla temperatura impostata (isoterma)
T°C = temperatura impostata in °C
G = flusso del gas di lavaggio (argon ultrapuro) in mL/minuto
R = attivazione della lettura in atomizzazione.

Il ciclo elettrotermico riportato è valido nel caso in cui si utilizzi un tubo di grafite pirolitica; in tutti gli altri casi andrà ottimizzato, prendendo come riferimento quello generalmente consigliato dal manuale d'uso fornito a corredo dell'apparecchiatura.

7.2 Analisi

7.2.1 Determinazione diretta

Dopo aver impostato i parametri strumentali come descritto in (7.1), costruire la curva di taratura utilizzando almeno tre soluzioni di riferimento scelte nel campo di indagine analitico,

preparate diluendo opportunamente la soluzione (6.3), e il bianco dei reattivi. Ripetere la misura di ogni soluzione di riferimento compreso il bianco almeno tre volte.
Quindi, eseguire l'analisi dei campioni effettuando almeno tre letture per ogni soluzione da analizzare; si considerano accettabili i valori che forniscono un coefficiente di variazione inferiore al 10%. Le analisi dei campioni, delle soluzioni di riferimento e del bianco dei reattivi devono essere effettuate nelle stesse condizioni strumentali. Se la risposta del campione incognito analizzato cade al di fuori dell'intervallo di linearità, diluire opportunamente il campione per riportarlo nel campo di linearità. Qualora risulti necessaria una diluizione del campione talmente elevata da esaltare gli errori connessi alla suddetta operazione è preferibile ripetere sia la taratura che l'analisi riducendo la quantità di campione iniettato nel fornetto di grafite oppure aumentando il flusso di gas di lavaggio in atomizzazione.
Nel caso in cui sia richiesta l'analisi di un numero notevole di campioni si consiglia di controllare la taratura inserendo ogni cinque campioni una soluzione di controllo utilizzata per la taratura e verificando che il valore di quest'ultima risulti entro il ±5% del valore atteso.

7.2.2 Metodo delle aggiunte note

Il campione viene suddiviso in quattro aliquote, di cui una rimane tal quale, mentre alle altre si aggiungono concentrazioni crescenti dell'analita dello stesso ordine di grandezza di quella attesa per il campione. Misurare l'assorbanza delle quattro soluzioni e del bianco dei reattivi seguendo le indicazioni riportate al Paragrafo 7.1, avendo cura di ripetere le misure almeno tre volte. La concentrazione totale di berillio presente nelle aliquote non deve superare il valore limite oltre il quale la risposta strumentale non è più lineare.

8. Calcoli

8.1 Determinazione diretta

La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le concentrazioni (µg/L) delle soluzioni di riferimento in ascissa e le assorbanze corrispondenti, corrette del bianco, in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%. Calcolare quindi la concentrazione del berillio nel campione utilizzando l'equazione ottenuta dalla regressione lineare, tenendo conto dell'eventuale diluizione effettuata.

8.2 Metodo delle aggiunte

Siano C_1, C_2, C_3, rispettivamente le concentrazioni corrispondenti alla 1ª, 2ª, 3ª aggiunta e A_0, A_1, A_2, A_3, le assorbanze del campione (A_0) e del campione addizionato delle varie aggiunte, sottratte del bianco dei reattivi. Calcolare la retta di regressione che interpola i valori di assorbanza in funzione delle concentrazioni aggiunte, attribuendo al campione incognito di assorbanza A_0 una concentrazione "aggiunta" uguale a zero. La concentrazione incognita riferita al campione sarà data dal valore dell'intercetta sull'asse (x) cambiato di segno. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%.

9. Qualità del dato

Prove effettuate (n=5) da quattro laboratori su soluzioni sintetiche di acqua deionizzata contenenti 1,0 e 4,0 µg/L di berillio hanno fornito valori del coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100, compresi tra l'1 e il 3% ed un'accuratezza del 2%. Non essendo stati utilizzati materiali di riferimento, l'accuratezza va intesa come grado di accordo tra il risultato della misurazione e il valore di riferimento accettato.
Va tenuto presente che la precisione e accuratezza di un metodo generalmente peggiorano

all'aumentare della complessità della matrice. Su campioni di acque di scarico, ad una concentrazione di 0,45 µg/L lo Standard Methods riporta una riproducibilità del 35% ed un'accuratezza del 15%.

Nota: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico". Caratterizzato il materiale di riferimento non certificato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, è possibile verificare gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.*

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA), 3-24/3-31.

BURBA P., WILLMER P.G., BETZ M. & FUCHS F. (1983): "Atomic absorption determination of beryllium traces in natural waters", *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **13**, 177-191.

ELLIS G.W., HODGE F.V., DARBY A.D. & JONES L.C. (1988): "Determination of beryllium in liquid and solid waste samples by flame and furnace AAS", *Atom. Spectrosc.*, **9**, (6), 181-187.

EPSTEIN M.S., RAINS T.C., BRADY T.J., MOODY J.R. & BARNES I.L. (1978): "Determination of several trace metals in simulated fresh waters by graphite furnace atomic emission spectrometry", *Anal. Chem.*, **50**, (7), 874-880.

IRSA (1986 a): "I metalli nelle acque: origine, distribuzione, metodi di rimozione", Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **71**, 21 - 22.

IRSA (1986 b): "Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **75**, 263-278.

KORKISCH J., SORIO A. & STEFFAN I. (1976): "Atomic absorption determination of beryllium in liquid environmental samples", *Talanta*, **23**, 289-294.

LAGAS P. (1978): "Determination of beryllium, barium, vanadium and some others elements in water ", *Anal. Chim. Acta*, **98**, 261-267.

UNICHIM (1996): "*Linee Guida per la taratura della strumentazione analitica – Spettrometri di assorbimento atomico ad atomizzazione elettrotermica (EAAS)*", Manuale 177/2, Milano.

VANHOE H., VANDECASTEELE C., DESMET B. & DAMS R. (1988): " Determination of beryllium in environmental samples by electrothermal atomic absorption spectrometry", *J. Anal. Atom. Spectrom.*, **3**, 703-707.

3110. Boro

Introduzione

La presenza di boro nelle acque superficiali è determinata da sorgenti puntuali (effluenti sia domestici che industriali, a causa del suo impiego nei formulati di alcuni detergenti e in processi industriali) e diffuse, a seguito del dilavamento di terreni contenenti boro. Raramente si riscontrano concentrazioni superiori a 1 mg/L, ad eccezione delle acque minerali e/o termali.
Vengono descritti nel seguito due metodi spettrofotometrici, l'uno basato sulla reazione del boro con la curcumina da impiegare nell'intervallo delle basse concentrazioni (0,1-1 mg/L), l'altro basato sulla reazione con l'acido carminico adatto ad apprezzare concentrazioni più elevate (1-10 mg/L).

METODO A1 - Determinazione spettrofotometrica con curcumina

1. Principio del metodo

Il boro presente nelle acque reagisce con curcumina formando un composto di colore rosso chiamato rosocianina, che può essere determinato per via spettrofotometrica alla lunghezza d'onda di 540 nm.
Dalla misura dell'assorbanza della soluzione si ricava la concentrazione mediante confronto con una curva di taratura ottenuta con soluzioni a concentrazioni note comprese nel campo di indagine analitica.

2. Campo d'applicazione

Il metodo può essere applicato alle acque naturali, potabili e agli scarichi industriali e domestici nell'intervallo di concentrazioni comprese tra 100 e 1000 µg/L se si preleva 1,0 mL di campione. Tale intervallo può essere esteso variando il volume di campione o ricorrendo alla diluizione.
Effettuando 10 determinazioni su uno stesso campione avente un contenuto di boro pari a 100 µg/L, si è potuto calcolare un limite di rivelabilità, espresso come tre volte lo scarto tipo, di 10 µg/L.

3. Interferenze e cause di errore

Interferiscono i nitrati se presenti in concentrazione superiore a 15 mg/L, espressa come azoto.
La durezza totale interferisce a concentrazioni superiori a 100 mg/L come $CaCO_3$ in quanto provoca torbidità nella soluzione alcoolica finale. Questa interferenza viene eliminata trattando il campione con una resina cationica forte, come illustrato al Paragrafo (7.2) seguente.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione debbono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". In particolare si raccomanda di conservare il campione in recipienti di polietilene.

5. Apparecchiature

5.1 Normale attrezzatura da laboratorio

Per evitare possibili fenomeni di cessione evitare l'impiego di vetreria al borosilicato. Si raccomanda l'impiego di teflon, polietilene, polipropilene, quarzo o altro materiale caratterizzato da irrilevante capacità di cessione o di adsorbimento di boro.

5.2 Spettrofotometro per misure alla lunghezza d'onda di 540 nm, munito di celle aventi cammino ottico di 1 cm.

5.3 Bagno termostatico in grado di mantenere 55±2°C.

5.4 Capsule per evaporazione della capacità di 50–100 mL preferibilmente di teflon.

6. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere di tipo ultrapuro per analisi in tracce. Per la preparazione dei reattivi e delle soluzioni a concentrazione nota di boro, nonché per il risciacquo finale della vetreria dovrà essere usata acqua deionizzata.

6.1 Acido cloridrico concentrato (d=1,19)

6.2 Alcool etilico al 95%

6.3 Soluzione concentrata di boro (1,000 g/L)

Sciogliere 0,5716 g di acido borico anidro (H_3BO_3) di elevata purezza in acqua e portare a volume a 100 mL con acqua.
La soluzione va conservata in recipiente ben chiuso di polietilene o polipropilene.

6.4 Soluzione diluita di boro (1,00 mg/L)

Diluire opportunamente con acqua la soluzione (6.3) in modo da avere una concentrazione di 1,00 mg/L. Conservare come descritto in (6.3).

6.5 Soluzione di curcumina

Sciogliere 40 mg di curcumina ($C_{21}H_{20}O_6$) e 5,0 g di acido ossalico diidrato ($H_2C_2O_4 \cdot 2H_2O$) in 80 mL di alcool etilico (6.2); aggiungere 4,2 mL di acido cloridrico (6.1) e portare a 100 mL con alcool etilico. Filtrare se la soluzione è torbida. La soluzione è stabile per almeno una settimana se conservata in frigorifero.

6.6 Resina cationica forte in forma protonata

7. Procedimento

7.1 Taratura

Preparare una curva di taratura utilizzando soluzioni di riferimento in numero sufficiente a garantire una corretta interpolazione delle concentrazioni misurate. Per la preparazione delle soluzioni di riferimento, prelevare, con micropipetta tarata, volumi della soluzione diluita di boro (6.4), (es. 0,1 mL; 0,25 mL; 0,5 mL e 1 mL), e disporli nelle capsula (5.4) aggiungendo, se necessario, acqua per portare il volume finale a 1 mL. Per il bianco porre in capsula solo 1 mL di acqua.
Aggiungere 4,0 mL di soluzione di curcumina (6.5) ad ogni capsula, agitare dolcemente con moto rotatorio e collocarle sul bagnomaria (5.3) a 55±2°C per due ore, sotto cappa. Poiché un aumento dei tempi di evaporazione e rimozione dell'acido cloridrico porta ad un incremento del colore della soluzione finale, è importante mantenere questo tempo costante per le soluzioni di taratura e i campioni, ed è indispensabile utilizzare capsule identiche per tipo, diametro e materiale per assicurare uguali tempi di evaporazione.
Dopo che le capsule si sono raffreddate a temperatura ambiente, aggiungere ad ogni capsula 10 mL di alcool etilico (6.2) e mescolare fino a completa dissoluzione del residuo rosso. Trasferire quantitativamente il contenuto in matracci tarati da 25 mL portando a volume con alcool etilico (6.2). Mescolare capovolgendo i matracci e leggere l'assorbanza a 540 nm utilizzando celle da 1 cm di cammino ottico ed operando la correzione del bianco dei reattivi. Costruire la curva di taratura riportando in ordinate l'assorbanza ed in ascisse le concentrazioni di boro in mg/L. Le letture devono essere effettuate entro un'ora dall'essiccamento dei residui.

7.2 Rimozione dell'interferenza dovuta alla durezza

Ad un'aliquota di campione (10–25 mL) aggiungere circa 0,5 g di resina cationica forte (6.6) ed agitare con ancoretta magnetica per almeno 5 minuti; decantare e se necessario filtrare su carta da filtro rapida per eliminare la resina.

7.3 Determinazione

Effettuato il trattamento come riportato in (7.2), prelevare 1 mL di campione e disporlo su una capsula (5.4). Procedere quindi come descritto per la preparazione della curva di taratura, rispettando scrupolosamente tempi e modalità operative.
Se la risposta del campione cade al di fuori dell'intervallo individuato dalla curva di taratura, diluire la soluzione in esame prima dell'analisi strumentale.

8. Calcoli

Dal valore dell'assorbanza, corretto del valore del bianco, risalire alla concentrazione del boro nel campione utilizzando la curva di taratura.
Nel caso in cui sia stata eseguita una diluizione del campione moltiplicare il risultato per il fattore di diluizione.

9. Qualità del dato

Dati pubblicati (APHA, 1998), relativi a prove di interconfronto effettuate da trenta laboratori su una soluzione sintetica di acqua deionizzata contenente 0,24 mg/L di boro, mostrano un coefficiente di variazione, [CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100] intorno al 20% ed un'accuratezza dell'1%. Va tenuto presente che la precisione e accuratezza di un metodo generalmente peggiorano all'aumentare della complessità della matrice.

METODO A2 – Determinazione spettrofotometrica con carminio

1. Principio del metodo

Una soluzione di carminio o di acido carminico in acido solforico concentrato in presenza di borati cambia colore passando dal rosso al blu. L'intensità della nuova colorazione è funzione della concentrazione del boro e viene misurata alla lunghezza d'onda di 585 nm.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile alle acque naturali e di scarico, nell'intervallo di concentrazione compreso fra 1,0 e 10,0 mg/L quando si prelevano 2 mL di campione.
Effettuando 10 determinazioni su uno stesso campione avente un contenuto di boro pari a 0,2 mg/L, si è potuto calcolare un limite di rivelabilità, espresso come tre volte lo scarto tipo, di 0,080 mg/L.

3. Interferenze e cause di errore

Gli ioni generalmente presenti nell'acqua non interferiscono.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione debbono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".

5. Apparecchiature

Evitare l'impiego di vetreria al borosilicato. Si raccomanda l'impiego di teflon, polietilene, polipropilene o altro materiale privo di boro.

5.1 *Spettrofotometro* per misure nel campo del visibile, munito di celle aventi cammino ottico di almeno 1 cm e dotate di tappi in teflon.

6. Reattivi

Tutti i reattivi debbono essere puri per analisi e l'acqua deve essere bidistillata o distillata e deionizzata.

6.1 Soluzione concentrata di boro (1 mL=0,1 mg)

Pesare 0,5716 g di acido borico anidro (H_3BO_3) in acqua e diluire ad 1 litro.

6.2 Acido cloridrico concentrato HCl *(d=1,19)*

6.3 Soluzione di acido cloridrico (1+11) (v/v)

Prelevare 83 mL di HCl concentrato (6.2) e portare a volume con acqua in matraccio tarato da 1 litro.

6.4 Acido solforico concentrato (H_2SO_4) (d=1,84)

6.5 Soluzione di acido carminico

Sciogliere 0,92 g di carminio N.F.40, o di acido carminico (il principale costituente del carminio) in 1 litro di acido solforico concentrato (6.4); questa operazione può richiedere fino a 2 ore di tempo.

6.6 Soluzione di idrossido di sodio 1 M

Sciogliere 40 g di NaOH in 1 litro di acqua.

7. Procedimento

7.1 Taratura

Prelevare esattamente 1,0 mL; 2,5 mL; 5,0 mL; 7,5 mL e 10,0 mL della soluzione concentrata di boro (6.1) e diluire a 100 mL con acqua. Le soluzioni di riferimento contengono, rispettivamente, 1,0 mg/L; 2,5 mg/L; 5,0 mg/L; 7,5 mg/L e 10,0 mg/L di boro. Preparare anche un bianco con 100 mL di acqua.
Trasferire 2,0 mL di ciascuna soluzione in un pallone o in un tubo da saggio. Trattare le soluzioni di riferimento e il bianco esattamente come il campione (Paragrafo 7.2).
Aggiungere 2 gocce di HCl concentrato (6.2) e, con molta cautela, 10,0 mL di acido solforico concentrato (6.4); agitare e lasciare raffreddare a temperatura ambiente. Aggiungere poi 10,0 mL della soluzione di acido carminico (6.5), agitare e quindi lasciare a riposo per circa un'ora. Misurare a 585 nm l'assorbanza della soluzione così ottenuta, impiegando come riferimento un bianco di acqua trattato come descritto per le soluzioni di riferimento e il campione da analizzare e avendo cura che le celle siano tappate. Riportare in grafico l'assorbanza in funzione del contenuto in boro delle cinque soluzioni (rispettivamente 2, 5, 10, 15 e 20 µg).
È opportuno effettuare un controllo giornaliero della taratura.

7.2 Determinazione

Trasferire in una beuta o capsula un'aliquota "V" del campione da analizzare contenente 2÷20 µg di boro, alcalinizzare con un leggero eccesso di NaOH 1 M (6.6) ed evaporare a secchezza su bagno termostatico. Eliminare in stufa a 500-550°C le eventuali sostanze organiche presenti e lasciar raffreddare il residuo; aggiungere poi 2,5 mL di HCl 1+11 (6.3) e agitare con una bacchetta di gomma o di materiale plastico per facilitare la dissoluzione del residuo. Versare la soluzione in un tubo da centrifuga e, se necessario, centrifugare.
Trasferire quindi 2,0 mL della soluzione centrifugata in un pallone o in un tubo da saggio.
Procedere quindi come descritto in precedenza (a partire dal terzo capoverso del Paragrafo 7.1) per la preparazione della curva di taratura.

8. Calcoli

$$C = \frac{a}{V}$$

dove:
C= concentrazione ($mg \cdot L^{-1}$) di boro;
a = quantità (µg) di boro ricavati dalla curva di taratura;
V = volume (mL) del campione sottoposto ad analisi.

9. Qualità del dato

Prove effettuate in quintuplicato da un solo laboratorio su soluzioni sintetiche di acqua deionizzata contenenti 1 mg/L, 5 mg/L e 10 mg/L di boro hanno fornito valori del coefficiente di variazione, [CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100] compresi tra il 3% e l'8%. Va tenuto presente che la precisione di un metodo generalmente peggiora all'aumentare della complessità della matrice.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed. (Washington, APHA), 4-21/4-23.

BUNTON N.G. & TAIT B.H. (1969): "Determination of boron in waters and effluents using curcumin", *J. Amer. Water Works Assoc.*, **61**, 357.

CALLICOAT D.L. & WOLSZON J.F. (1959): "Procédé à l'acide carminique pour la détermination du bore", *Anal. Chem.*, **31**, 1434.

RODIER J. (1978): "*L'Analyse de L'Eau: eaux naturelles, eaux residuaires, eau de mer*", 6° ed. (Paris, Dunod).

SMITH W.C., GOODIE A.J. & SILVERSTON J.N. (1955): "Détermination colorimétrique des traces d'acide borique dans les milieux biologiques", *Anal. Chem.*, **27**, 295.

3120. Cadmio

Il cadmio è presente in quantità molto basse nella crosta terrestre; esso infatti occupa il 64° posto in ordine di abbondanza. La concentrazione di cadmio in acque dolci superficiali non contaminate è di circa 0,01 µg/L e valori simili si hanno in acque marine, mentre nella crosta terrestre varia da 0,1 a 0,5 mg/kg e risulta sempre presente assieme allo zinco. Il cadmio è largamente usato nei processi galvanici di elettroplaccatura di altri metalli o leghe, sia per sfruttare il suo basso punto di fusione (leghe per saldature), che per migliorare le proprietà meccaniche; nella produzione di pigmenti colorati, come stabilizzante nella produzione di PVC e nella produzione di batterie ricaricabili a lunga durata (Cd/Ni e Cd/Ag). Lo stato di ossidazione del cadmio è il bivalente, anche se vengono riportati alcuni composti di cadmio monovalente. Nelle acque dolci superficiali esso è presente sia allo stato di ione libero, che complessato con sostanze umiche, ioni minerali o agenti chelanti organici; generalmente forma dei complessi con numero di coordinazione 4 e 6. Il cadmio è facilmente adsorbito sui materiali solidi umici. Il cadmio è estremamente tossico per gli organismi acquatici.
Criteri di qualità proposti da vari enti internazionali (ente di protezione ambientale canadese, US EPA, WRC-UK) forniscono per il cadmio solubile un intervallo di valori (0,2-10 µg/L) per la protezione della vita acquatica e (3-5 µg/L) per le acque ad uso potabile.
Il D.Lgs. 152/99 in materia di tutela delle acque dall'inquinamento prevede criteri di qualità diversificati in funzione degli usi (5 µg/L per le acque sotterranee, 1-5 µg/L per le acque superficiali destinate alla potabilizzazione e 0,2-2,5 µg/L di cadmio, espresso come cadmio totale, per le acque idonee alla vita dei pesci). Il D.Lgs. 31/2001 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano fissa una concentrazione massima ammissibile di 5 µg/L.

METODO A - Determinazione per spettrometria di assorbimento atomico con atomizzazione in fiamma (F-AAS)

1. Principio del metodo

Il cadmio viene determinato per aspirazione diretta del campione nella fiamma (aria-acetilene) di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico. Dalla misura del segnale di assorbanza a 228,8 nm si ricava la concentrazione mediante confronto con una curva di taratura ottenuta con soluzioni a concentrazioni note di analita, comprese nel campo di indagine analitico.

2. Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione del cadmio in campioni di acque naturali e di scarico nell'intervallo di concentrazione da 0,02 a 2,0 mg/L. Per concentrazioni superiori a 2 mg/L è possibile rientrare nell'intervallo indicato ricorrendo alla diluizione del campione oppure facendo ricorso ad una lunghezza d'onda meno sensibile, prendendo come riferimento quelle generalmente consigliate dal manuale d'uso fornito a corredo dell'apparecchiatura.
Effettuando 10 determinazioni su uno stesso campione avente un contenuto di cadmio pari a 0,02 mg/L, alternate con una misura del bianco, si è potuto calcolare un limite di rivelabilità, espresso come tre volte lo scarto tipo, di 0,002 mg/L.

3. Interferenze e cause di errore

L'utilizzo del correttore di fondo consente di minimizzare gli assorbimenti aspecifici eventualmente presenti. Nel caso in cui si debba determinare l'analita in una matrice sconosciuta o scarsamente caratterizzata è consigliabile ricorrere al metodo delle aggiunte note. Tale metodo permette di minimizzare le interferenze di matrice di tipo fisico e/o chimico (variazioni di densità, viscosità, tensione superficiale) eventualmente presenti.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". Si consiglia di conservare i campioni in bottiglie di polipropilene, o altro materiale caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli, precedentemente trattate con HNO_3 1 M per una notte e successivamente neutralizzate con acqua ad elevato grado di purezza. Per determinare soltanto il cadmio disciolto, il campione viene filtrato dopo il prelievo su membrana da 0,45 µm (acetato di cellulosa o policarbonato) e acidificato fino a pH<2 con HNO_3 (6.1). L'analisi deve essere effettuata prima possibile e comunque il campione acidificato rimane stabile per almeno una settimana dal prelievo. Per la determinazione quantitativa del cadmio totale si rimanda alle Sezioni 3000 e 3010.

5. Apparecchiature

5.1 *Spettrofotometro di assorbimento atomico*, corredato di bruciatore standard per aria-acetilene e di dispositivo per la correzione degli assorbimenti aspecifici.

5.2 *Lampada a catodo cavo* o altra sorgente luminosa capace di emettere lo spettro dell'elemento in esame.

6. Reattivi

Tutti i reattivi e l'acqua utilizzata per i lavaggi e la preparazione delle soluzioni di riferimento devono essere ad elevato grado di purezza.

6.1 *Acido nitrico concentrato (d=1,40)*

6.2 *Soluzione concentrata di cadmio (1000 mg/L)*

Si consiglia di utilizzare soluzioni di riferimento ad elevato grado di purezza disponibili in commercio.

6.3 *Soluzione diluita di cadmio (10,0 mg/L)*

Trasferire 1,0 mL della soluzione (6.2) in pallone tarato da 100 mL, aggiungere 1 mL di HNO_3 (6.1) e portare a volume con acqua ad elevato grado di purezza. Questa soluzione è stabile per almeno un mese se conservata a 4°C in un contenitore caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli (polietilene o policarbonato) e opportunamente chiuso in modo da evitare sia l'evaporazione del solvente che eventuali contaminazioni.

7. Procedimento

7.1 Ottimizzazione dei parametri strumentali

Per migliorare le prestazioni analitiche dell'apparecchiatura e per minimizzare eventuali interferenze, procedere all'ottimizzazione dei parametri strumentali seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento o in altri protocolli standardizzati. In Tab. 1 sono elencate, a titolo di esempio, le condizioni operative tipiche per l'esecuzione delle analisi.

Tabella 1: Condizioni operative strumentali	
Lunghezza d'onda (nm)	228,8
Fenditura (nm)	0,7
Correzione del fondo	attivata
Fiamma	aria-acetilene
Intensità di corrente della lampada (mA)	come da specifica

7.2 Analisi

7.2.1 Determinazione diretta

Dopo aver impostato i parametri strumentali come descritto in (7.1), costruire la curva di taratura utilizzando almeno tre soluzioni di riferimento preparate diluendo opportunamente la soluzione (6.3), in modo tale da coprire l'intero campo di indagine analitico, e il bianco dei reattivi. Ripetere la misura di ogni soluzione di riferimento compreso il bianco almeno tre volte.
Quindi, eseguire l'analisi dei campioni effettuando almeno tre letture per ogni soluzione da analizzare; si considerano accettabili i valori che forniscono un coefficiente di variazione inferiore al 5%. Le analisi dei campioni, delle soluzioni di riferimento e del bianco dei reattivi devono essere effettuate nelle stesse condizioni strumentali. Se la risposta del campione incognito analizzato cade al di fuori dell'intervallo di linearità diluire opportunamente il campione per riportarlo nel campo di linearità. Qualora risulti necessaria una diluizione del campione talmente elevata da esaltare gli errori connessi alla suddetta operazione è preferibile ripetere sia la taratura che l'analisi ricorrendo ad un'altra riga analitica meno sensibile.
Nel caso in cui sia richiesta l'analisi di un numero notevole di campioni si consiglia di controllare la taratura inserendo ogni cinque campioni una soluzione di controllo utilizzata per la taratura e verificando che il valore di quest'ultima risulti entro il ±5% del valore atteso.

7.2.2 Metodo delle aggiunte note

Il campione viene suddiviso in quattro aliquote, di cui una rimane tal quale, mentre alle altre si aggiungono concentrazioni crescenti dell'analita dello stesso ordine di grandezza di quella attesa per il campione. Misurare l'assorbanza delle quattro soluzioni e del bianco dei reattivi seguendo le indicazioni riportate al Paragrafo 7.1, avendo cura di ripetere le misure almeno tre volte. La concentrazione totale di cadmio presente nelle aliquote deve comunque essere inferiore al valore limite oltre il quale la risposta strumentale non è più lineare.

8. Calcoli

8.1 Determinazione diretta

La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le concentrazioni (mg/L) delle soluzioni di riferimento in ascissa e le assorbanze corrispondenti, corrette del bianco, in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%. Calcolare quindi la concentrazione del cadmio nel campione utilizzando l'equazione ottenuta dalla regressione lineare, tenendo conto dell'eventuale diluizione effettuata.

8.2 Metodo delle aggiunte

Siano C_1, C_2, C_3, rispettivamente le concentrazioni corrispondenti alla 1ª, 2ª, 3ª aggiunta e A_0, A_1, A_2, A_3, le assorbanze del campione (A_0) e del campione addizionato delle varie aggiunte, sottratte del bianco dei reattivi. Calcolare la retta di regressione che interpola i valori di assorbanza in funzione delle concentrazioni aggiunte, attribuendo al campione incognito di assorbanza A_0 una concentrazione "aggiunta" uguale a zero. La concentrazione incognita riferita al campione sarà data dal valore dell'intercetta sull'asse (x) cambiato di segno. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%.

9. Qualità del dato

Prove effettuate (n=5) da sei laboratori su campioni di acque di scarico, dopo aggiunta di quantità note di cadmio in modo da ottenere una concentrazione di 0,02 mg/L, hanno fornito valori del coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100, compresi tra l'1,1% ed il 9,3% ed un'accuratezza compresa tra il 2% ed il 7%.
Non essendo stati utilizzati materiali di riferimento, l'accuratezza va intesa come grado di accordo tra il risultato della misurazione e il valore di riferimento accettato.
Per acque di scarico, dopo aggiunta di quantità note di cadmio tali da realizzare una concentrazione finale di 0,05 mg/L, lo Standard Methods riporta una riproducibilità del 21,6% ed un'accuratezza dell'8,2%.

Nota: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".*
Caratterizzato il materiale di riferimento non certificato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, è possibile verificare gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

METODO B - Determinazione per spettrometria di assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica (ETA-AAS)

1. Principio del metodo

Il cadmio viene determinato per iniezione diretta del campione nel fornetto di grafite di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico. Dalla misura del segnale di assorbanza a 228,8 nm si ricava la concentrazione mediante confronto con una curva di taratura ottenuta con soluzioni a concentrazioni note di analita, comprese nel campo di indagine analitico.

2. Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione del cadmio in campioni di acque naturali e di scarico nell'intervallo di concentrazione da 0,1 a 4,0 µg/L. Per concentrazioni superiori a 4 µg/L è possibile rientrare nell'intervallo indicato ricorrendo alla diluizione del campione.
Effettuando 10 determinazioni su uno stesso campione avente un contenuto di cadmio pari a 0,1 µg/L, alternate con una misura del bianco, si è potuto calcolare un limite di rivelabilità, espresso come tre volte lo scarto tipo, di 0,02 µg/L (volume iniettato: 25 µL di campione e

25 µL di modificante). Tale limite dipende dalla matrice e dalle condizioni strumentali applicate; può essere migliorato aumentando il volume di campione iniettato. Tuttavia applicando queste modalità vengono esaltati gli effetti delle specie interferenti.

3. Interferenze e cause di errore

L'utilizzo del correttore di fondo consente di minimizzare gli assorbimenti aspecifici eventualmente presenti. Nel caso in cui si debba determinare l'analita in una matrice sconosciuta o scarsamente caratterizzata è consigliabile ricorrere al metodo delle aggiunte note. Tale metodo permette di minimizzare le interferenze di tipo fisico e/o chimico eventualmente presenti. Il ricorso ad un idoneo modificatore consente di rendere la matrice più volatile o di formare composti più stabili con l'elemento in esame; mediante un opportuno ciclo elettrotermico è possibile allontanare la matrice senza perdere l'analita di interesse.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". In particolare, considerando le basse concentrazioni da determinare, si consiglia di conservare i campioni in bottiglie di polipropilene o altro materiale caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli, precedentemente trattate con HNO_3 1 M per una notte e successivamente neutralizzate con acqua ad elevato grado di purezza. Per determinare soltanto il cadmio disciolto, il campione viene filtrato dopo il prelievo su membrana da 0,45 µm (acetato di cellulosa o policarbonato) e acidificato fino a pH<2 con HNO_3 (6.1). L'analisi deve essere effettuata prima possibile e comunque il campione acidificato rimane stabile per almeno una settimana dal prelievo. Per la determinazione quantitativa del cadmio totale si rimanda alle Sezioni 3000 e 3010.
È buona norma considerare sempre l'opportunità di predisporre un "bianco di campo", ottenuto semplicemente mediante lo stoccaggio di un'aliquota di acqua ultrapura in un recipiente identico a quello dei prelievi, da sottoporre successivamente a tutte le fasi analitiche previste per i campioni. Altri sistemi di controllo della qualità del campionamento consistono nell'uso di campioni replicati, nell'attivazione di precauzioni per proteggere i campioni in modo da evitare qualsiasi possibile contaminazione, nell'avvinamento regolare dei recipienti.

5. Apparecchiature

5.1 Spettrofotometro di assorbimento atomico, corredato di fornetto di grafite e di dispositivo per la correzione degli assorbimenti aspecifici.

5.2 Lampada a catodo cavo o altra sorgente luminosa capace di emettere lo spettro dell'elemento in esame.

5.3 Autocampionatore oppure micropipette tarate per il dosaggio di pochi µL.

5.4 Dispositivo per la registrazione dell'assorbanza, adatto ad evidenziare la forma del picco.

5.5 Dispositivo che fornisce argon ultrapuro

6. Reattivi

Tutti i reattivi e l'acqua utilizzata per i lavaggi e la preparazione delle soluzioni di riferimento devono essere ad elevato grado di purezza.

6.1 Acido nitrico concentrato (d=1,40)

6.2 Soluzione concentrata di cadmio (100 mg/L)

Si consiglia di utilizzare soluzioni di riferimento ad elevato grado di purezza disponibili in commercio.

6.3 Soluzione diluita di cadmio (200 µg/L)

Trasferire 200 µL della soluzione (6.2) in pallone tarato da 100 mL, aggiungere 1 mL di HNO_3 (6.1) e portare a volume con acqua ad elevato grado di purezza. Questa soluzione è stabile per almeno un mese se conservata a 4°C in un contenitore caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli (polietilene o policarbonato) e opportunamente chiuso in modo da evitare sia l'evaporazione del solvente che eventuali contaminazioni.

6.4 Modificatore di matrice $(NH_4)H_2PO_4$ (10 g/L)

Sciogliere 1,0 g di $(NH_4)H_2PO_4$ di grado ultrapuro in acqua deionizzata e portare a volume in matraccio tarato da 100 mL in polietilene. È possibile utilizzare anche altri modificatori seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento.

7. Procedimento

7.1 Ottimizzazione dei parametri strumentali

Per migliorare le prestazioni analitiche dell'apparecchiatura e per minimizzare eventuali interferenze, procedere all'ottimizzazione dei parametri strumentali seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento o in altri protocolli standardizzati.
In Tabb. 1-2 sono elencate, a titolo di esempio, le condizioni operative tipiche per l'esecuzione delle analisi.

Tabella 1: Condizioni operative strumentali

Lunghezza d'onda (nm)	228,8
Fenditura (nm)	0,7
Rilevazione del segnale	altezza o area del picco
Correzione del fondo	attivata
Tubo	pirolitico
Intensità di corrente della lampada (mA)	come da specifica
Volume del campione (µL)	25
Volume del modificante di matrice (µL)	25

Tabella 2: Programma termico

	T°C	RT	HT	G	R
Essiccamento	120	20	20	300	
Incenerimento	700	40	20	300	
Atomizzazione	2400	0	5	0	*
Pulizia	2600	1	5	300	

RT = tempo in secondi della rampa di temperatura
HT = tempo in secondi di permanenza alla temperatura impostata (isoterma)
T°C = temperatura impostata in °C
G = flusso del gas di lavaggio (argon ultrapuro) in mL/minuto
R = attivazione della lettura in atomizzazione.

Il ciclo elettrotermico riportato è valido nel caso in cui si utilizzi un tubo di grafite pirolitica;

in tutti gli altri casi andrà ottimizzato, prendendo come riferimento quello generalmente consigliato dal manuale d'uso fornito a corredo dell'apparecchiatura.

7.2 Analisi

7.2.1 Determinazione diretta

Dopo aver impostato i parametri strumentali come descritto in (7.1), costruire la curva di taratura utilizzando almeno tre soluzioni di riferimento scelte nel campo di indagine analitico, preparate diluendo opportunamente la soluzione (6.3), e il bianco dei reattivi. Ripetere la misura di ogni soluzione di riferimento compreso il bianco almeno tre volte.
Quindi, eseguire l'analisi dei campioni effettuando almeno tre letture per ogni soluzione da analizzare; si considerano accettabili i valori che forniscono un coefficiente di variazione inferiore al 10%. Le analisi dei campioni, delle soluzioni di riferimento e del bianco dei reattivi devono essere effettuate nelle stesse condizioni strumentali. Se la risposta del campione incognito analizzato cade al di fuori dell'intervallo di linearità, diluire opportunamente il campione per riportarlo nel campo di linearità. Qualora risulti necessaria una diluizione del campione talmente elevata da esaltare gli errori connessi alla suddetta operazione è preferibile ripetere sia la taratura che l'analisi riducendo la quantità di campione iniettato nel fornetto di grafite oppure aumentando il flusso di gas di lavaggio in atomizzazione.
Nel caso in cui sia richiesta l'analisi di un numero notevole di campioni si consiglia di controllare la taratura inserendo ogni cinque campioni una soluzione di controllo utilizzata per la taratura e verificando che il valore di quest'ultima risulti entro il ±5% del valore atteso.

7.2.2 Metodo delle aggiunte note

Il campione viene suddiviso in quattro aliquote, di cui una rimane tal quale, mentre alle altre si aggiungono concentrazioni crescenti dell'analita dello stesso ordine di grandezza di quella attesa per il campione. Misurare l'assorbanza delle quattro soluzioni e del bianco dei reattivi seguendo le indicazioni riportate al Paragrafo 7.1, avendo cura di ripetere le misure almeno tre volte. La concentrazione totale di cadmio presente nelle aliquote non deve superare il valore limite oltre il quale la risposta strumentale non è più lineare.

8. Calcoli

8.1 Determinazione diretta

La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le concentrazioni (µg/L) delle soluzioni di lavoro in ascissa e le assorbanze corrispondenti, corrette del bianco, in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%. Calcolare quindi la concentrazione di cadmio nel campione utilizzando l'equazione ottenuta dalla regressione lineare, tenendo conto dell'eventuale diluizione effettuata.

8.2 Metodo delle aggiunte

Siano C_1, C_2, C_3, rispettivamente le concentrazioni corrispondenti alla 1ª, 2ª, 3ª aggiunta e A_0, A_1, A_2, A_3, le assorbanze del campione (A_0) e del campione addizionato delle varie aggiunte, sottratte del bianco dei reattivi. Calcolare la retta di regressione che interpola i valori di assorbanza in funzione delle concentrazioni aggiunte, attribuendo al campione incognito di assorbanza A_0 una concentrazione "aggiunta" uguale a zero. La concentrazione incognita riferita al campione sarà data dal valore dell'intercetta sull'asse (x) cambiato di segno. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%.

9. Qualità del dato

Prove effettuate in quintuplicato, in un circuito di interconfronto, su soluzioni sintetiche in acqua deionizzata hanno fornito, dopo eliminazione di eventuali "outlier", i seguenti risultati:

Concentrazione attesa (µg/L)	0,5	2,0
Concentrazione trovata (µg/L)*	0,48 ± 0,03	1,9 ± 0,16
Numero di laboratori (n)	7	6
Ripetibilità (r%)	13,3	6,6
Riproducibilità (R%)	19,7	12,5
Accuratezza (%)**	4,0	5,0

** valor medio ± scarto tipo*
S(r)= scarto tipo di ripetibilità; S(R)= scarto tipo di riproducibilità
$r = 2\cdot(2)^{1/2}\cdot S(r) = 2{,}83\cdot S(r)$; $R = 2\cdot(2)^{1/2}\cdot S(R) = 2{,}83\cdot S(R)$
*** Non essendo stati utilizzati materiali di riferimento, l'accuratezza va intesa come grado di accordo tra il risultato della misurazione e il valore di riferimento accettato.*

Va tenuto presente che la precisione e accuratezza di un metodo generalmente peggiorano all'aumentare della complessità della matrice. Su campioni di acque di scarico, ad una concentrazione di 0,43 µg/L lo Standard Methods riporta una riproducibilità del 43% ed un'accuratezza del 16%.

Nota: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico". Caratterizzato il materiale di riferimento non certificato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, è possibile verificare gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.*

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA), 3-12/3-31.

IRSA (1986 a): "I metalli nelle acque: origine, distribuzione, metodi di rimozione", Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **71**, 21-22.

IRSA (1986 b): "Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **75**, 263-278.

UNICHIM (1995): "*Linee Guida per la taratura della strumentazione analitica - Spettrometri di assorbimento atomico a fiamma (FAAS)*", Manuale 177/1, Milano.

UNICHIM (1996): "*Linee Guida per la taratura della strumentazione analitica – Spettrometri di assorbimento atomico ad atomizzazione elettrotermica (EAAS)*", Manuale 177/2, Milano.

3130. Calcio

METODO A - Determinazione per spettrometria di assorbimento atomico con atomizzazione in fiamma (F-AAS)

1. Principio del metodo

Il calcio viene determinato per aspirazione diretta del campione nella fiamma (aria-acetilene) di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico. Dalla misura del segnale di assorbanza a 422,7 nm si ricava la concentrazione mediante confronto con una curva di taratura ottenuta con soluzioni a concentrazioni note di analita, comprese nel campo di indagine analitico.

2. Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione del calcio in campioni di acque naturali e di scarico nell'intervallo di concentrazione da 0,1 a 5,0 mg/L. Per concentrazioni superiori a 5 mg/L è possibile rientrare nell'intervallo indicato ricorrendo alla diluizione del campione oppure facendo ricorso ad una lunghezza d'onda meno sensibile, prendendo come riferimento quelle generalmente consigliate dal manuale d'uso fornito a corredo dell'apparecchiatura.
Effettuando 10 determinazioni su uno stesso campione avente un contenuto di calcio pari a 0,1 mg/L, alternate con una misura del bianco, si è potuto calcolare un limite di rivelabilità, espresso come tre volte lo scarto tipo, di 0,01 mg/L.

3. Interferenze e cause di errore

L'utilizzo del correttore di fondo consente di minimizzare gli assorbimenti aspecifici eventualmente presenti. Nel caso in cui si debba determinare l'analita in una matrice sconosciuta o scarsamente caratterizzata è consigliabile ricorrere al metodo delle aggiunte note. Tale metodo permette di minimizzare le interferenze di matrice di tipo fisico e/o chimico (variazioni di densità, viscosità, tensione superficiale) eventualmente presenti.
L'aggiunta di sali di lantanio allo 0,1% consente di eliminare le interferenze da ionizzazione. Le interferenze dovute alla presenza di alluminio, fosfati, solfati, silicati e vanadio sono controllate impiegando la fiamma di protossido di azoto/acetilene.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". Si consiglia di conservare i campioni in bottiglie di polipropilene, o altro materiale caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli, precedentemente trattate con HNO_3 1 M per una notte e successivamente neutralizzate con acqua ad elevato grado di purezza. Per determinare soltanto il calcio disciolto, il campione viene filtrato dopo il prelievo su membrana da 0,45 µm (acetato di cellulosa o policarbonato) e acidificato fino a pH<2 con HNO_3 (6.1). L'analisi deve essere effettuata prima possibile e comunque il campione acidificato rimane

stabile per almeno una settimana dal prelievo. Per la determinazione quantitativa del calcio totale si rimanda alle Sezioni 3000 e 3010.

5. Apparecchiature

5.1 Spettrofotometro di assorbimento atomico, corredato di bruciatore standard per aria-acetilene e/o protossido d'azoto-acetilene e di dispositivo per la correzione degli assorbimenti aspecifici.

5.2 Lampada a catodo cavo o altra sorgente luminosa capace di emettere lo spettro dell'elemento in esame.

6. Reattivi

Tutti i reattivi e l'acqua utilizzata per i lavaggi e la preparazione delle soluzioni di riferimento devono essere ad elevato grado di purezza.

6.1 Acido nitrico concentrato (d= 1,40)

6.2 *Soluzione di lantanio (1% La)*

6.3 Soluzione concentrata di calcio (1000 mg/L)

Si consiglia di utilizzare soluzioni di riferimento ad elevato grado di purezza disponibili in commercio.

6.4 Soluzione diluita di calcio (10,0 mg/L)

Trasferire 1,0 mL della soluzione (6.3) in pallone tarato da 100 mL, aggiungere 1 mL di HNO_3 (6.1) e portare a volume con acqua ad elevato grado di purezza. Questa soluzione è stabile per almeno un mese se conservata a 4°C in un contenitore caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli (polietilene o policarbonato) e opportunamente chiuso in modo da evitare sia l'evaporazione del solvente che eventuali contaminazioni.

7. Procedimento

7.1 Ottimizzazione dei parametri strumentali

Per migliorare le prestazioni analitiche dell'apparecchiatura e per minimizzare eventuali interferenze, procedere all'ottimizzazione dei parametri strumentali seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento o in altri protocolli standardizzati. In Tab. 1 sono elencate, a titolo di esempio, le condizioni operative tipiche per l'esecuzione delle analisi.

Tabella 1: Condizioni operative strumentali	
Lunghezza d'onda (nm)	422,7
Fenditura (nm)	0,7
Correzione del fondo	attivata
Fiamma	aria-acetilene e/o protossido d'azoto-acetilene
Intensità di corrente della lampada (mA)	come da specifica

7.2 Analisi

7.2.1 Determinazione diretta

Dopo aver impostato i parametri strumentali come descritto in (7.1), costruire la curva di taratura utilizzando almeno tre soluzioni di riferimento preparate diluendo opportunamente la soluzione (6.4), in modo tale da coprire l'intero campo di indagine analitico, e il bianco dei reattivi. Ripetere la misura di ogni soluzione di riferimento compreso il bianco almeno tre volte.
Quindi, eseguire l'analisi dei campioni effettuando almeno tre letture per ogni soluzione da analizzare; si considerano accettabili i valori che forniscono un coefficiente di variazione inferiore al 5%. Le analisi dei campioni, delle soluzioni di riferimento e del bianco dei reattivi devono essere effettuate nelle stesse condizioni strumentali. Se la risposta del campione incognito analizzato cade al di fuori dell'intervallo di linearità diluire opportunamente il campione per riportarlo nel campo di linearità. Qualora risulti necessaria una diluizione del campione talmente elevata da esaltare gli errori connessi alla suddetta operazione è preferibile ripetere sia la taratura che l'analisi ricorrendo ad un'altra riga analitica meno sensibile.
Nel caso in cui sia richiesta l'analisi di un numero notevole di campioni si consiglia di controllare la taratura inserendo ogni cinque campioni una soluzione di controllo utilizzata per la taratura e verificando che il valore di quest'ultima risulti entro il ±5% del valore atteso.

7.2.2 Metodo delle aggiunte note

Il campione viene suddiviso in quattro aliquote, di cui una rimane tal quale, mentre alle altre si aggiungono concentrazioni crescenti dell'analita dello stesso ordine di grandezza di quella attesa per il campione. Misurare l'assorbanza delle quattro soluzioni e del bianco dei reattivi seguendo le indicazioni riportate al Paragrafo 7.1, avendo cura di ripetere le misure almeno tre volte. La concentrazione totale di calcio presente nelle aliquote deve comunque essere inferiore al valore limite oltre il quale la risposta strumentale non è più lineare.

8. Calcoli

8.1 Determinazione diretta

La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le concentrazioni (mg/L) delle soluzioni di riferimento in ascissa e le assorbanze corrispondenti, corrette del bianco, in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%. Calcolare quindi la concentrazione del calcio nel campione utilizzando l'equazione ottenuta dalla regressione lineare, tenendo conto dell'eventuale diluizione effettuata.

8.2 Metodo delle aggiunte

Siano C_1, C_2, C_3, rispettivamente le concentrazioni corrispondenti alla 1ª, 2ª, 3ª aggiunta e A_0, A_1, A_2, A_3, le assorbanze del campione (A_0) e del campione addizionato delle varie aggiunte, sottratte del bianco dei reattivi. Calcolare la retta di regressione che interpola i valori di assorbanza in funzione delle concentrazioni aggiunte, attribuendo al campione incognito di assorbanza A_0 una concentrazione "aggiunta" uguale a zero. La concentrazione incognita riferita al campione sarà data dal valore dell'intercetta sull'asse (x) cambiato di segno. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%.

9. Qualità del dato

Prove effettuate (n=5) da quattro laboratori su campioni di acqua deionizzata contenenti 4 mg/L di calcio hanno fornito un valore del coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100, pari al 6,7% ed un'accuratezza del 2%.
Non essendo stati utilizzati materiali di riferimento, l'accuratezza va intesa come grado di accordo tra il risultato della misurazione e il valore di riferimento accettato.
Per acque di scarico, dopo aggiunta di quantità note di calcio tali da realizzare una concentrazione finale di 5 mg/L, lo Standard Methods riporta una riproducibilità del 4,2% ed un'accuratezza dello 0,4%.

Nota: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".*
Caratterizzato il materiale di riferimento non certificato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, è possibile verificare gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA), 3-12/3-24.

UNICHIM (1995): "*Linee Guida per la taratura della strumentazione analitica - Spettrometri di assorbimento atomico a fiamma (FAAS)*", Manuale 177/1, Milano.

3140. Cobalto

Il cobalto è il 32° elemento in ordine di abbondanza nella crosta terrestre. I minerali comuni di questo elemento sono CoS_2 e $CoAs_2$. Viene utilizzato per produrre leghe, magneti, pigmenti, vernici e come catalizzatore nell'industria petrolifera. Il suo isotopo radioattivo trova impiego in medicina.
Il cobalto forma composti Co^{2+} e Co^{3+} ed alcuni cobaltiti derivati dal biossido CoO_2. Gli ioni Co^{3+} sono fortemente ossidanti e quindi poco stabili, quelli Co^{2+} formano chelati con numero di ossidazione 4 o 6. La cobalamina o vitamina B_{12} ed i suoi derivati sono biologicamente attivi.
Per acque dolci incontaminate viene indicata una concentrazione di riferimento di 0,1 µg/L, mentre per le acque di mare il valore è più basso, 0,02 µg/L.
Negli ambienti acquatici, la tossicità del cobalto si manifesta a concentrazioni due-quattro ordini di grandezza superiori a quelle normalmente riscontrabili in acque dolci o marine.
Non sono stati fissati criteri di qualità per la protezione della vita acquatica e il consumo umano per il cobalto solubile, nè da parte dei paesi europei né da parte dell'EPA.

METODO A - Determinazione per spettrometria di assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica (ETA-AAS)

1. Principio del metodo

Il cobalto viene determinato per iniezione diretta del campione nel fornetto di grafite di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico. Dalla misura del segnale di assorbanza a 240,7 nm si ricava la concentrazione mediante confronto con una curva di taratura ottenuta con soluzioni a concentrazioni note di analita, comprese nel campo di indagine analitico.

2. Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione del cobalto in campioni di acque naturali e di scarico nell'intervallo di concentrazione da 2,0 a 40,0 µg/L. Per concentrazioni superiori a 40 µg/L è possibile rientrare nell'intervallo indicato ricorrendo alla diluizione del campione.
Effettuando 10 determinazioni su uno stesso campione avente un contenuto di cobalto pari a 2 µg/L, alternate con una misura del bianco, si è potuto calcolare un limite di rivelabilità, espresso come tre volte lo scarto tipo, di 0,4 µg/L (volume iniettato: 25 µL di campione e 25 µL di modificante). Tale limite dipende dalla matrice e dalle condizioni strumentali applicate; può essere leggermente migliorato aumentando il volume di campione iniettato. Tuttavia applicando queste modalità vengono esaltati gli effetti delle specie interferenti.

3. Interferenze e cause di errore

L'utilizzo del correttore di fondo consente di minimizzare gli assorbimenti aspecifici eventualmente presenti. Nel caso in cui si debba determinare l'analita in una matrice sconosciuta o scarsamente caratterizzata è consigliabile ricorrere al metodo delle aggiunte note. Tale metodo permette di minimizzare le interferenze di tipo fisico e/o chimico eventualmente presenti.

Il ricorso ad un idoneo modificatore consente di rendere la matrice più volatile o di formare composti più stabili con l'elemento in esame; mediante un opportuno ciclo elettrotermico è possibile allontanare la matrice senza perdere l'analita di interesse.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". In particolare, considerando le basse concentrazioni da determinare, si consiglia di conservare i campioni in bottiglie di polipropilene o altro materiale caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli, precedentemente trattate con HNO_3 1 M per una notte e successivamente neutralizzate con acqua ad elevato grado di purezza. Per determinare soltanto il cobalto disciolto, il campione viene filtrato dopo il prelievo su membrana da 0,45 µm (acetato di cellulosa o policarbonato) e acidificato fino a pH<2 con HNO_3 (6.1). L'analisi deve essere effettuata prima possibile e comunque il campione acidificato rimane stabile per almeno una settimana dal prelievo. Per la determinazione quantitativa del cobalto totale si rimanda alle Sezioni 3000 e 3010.
È buona norma considerare sempre l'opportunità di predisporre un "bianco di campo", ottenuto semplicemente mediante lo stoccaggio di un'aliquota di acqua ultrapura in un recipiente identico a quello dei prelievi, da sottoporre successivamente a tutte le fasi analitiche previste per i campioni. Altri sistemi di controllo della qualità del campionamento consistono nell'uso di campioni replicati, nell'attivazione di precauzioni per proteggere i campioni in modo da evitare qualsiasi possibile contaminazione, nell'avvinamento regolare dei recipienti.

5. Apparecchiature

5.1 *Spettrofotometro di assorbimento atomico*, corredato di fornetto di grafite e di dispositivo per la correzione degli assorbimenti aspecifici.

5.2 *Lampada a catodo cavo* o altra sorgente luminosa capace di emettere lo spettro dell'elemento in esame.

5.3 *Autocampionatore* oppure micropipette tarate per il dosaggio di pochi µL.

5.4 *Dispositivo per la registrazione dell'assorbanza*, adatto ad evidenziare la forma del picco.

5.5 *Dispositivo che fornisce argon ultrapuro*

6. Reattivi

Tutti i reattivi e l'acqua utilizzata per i lavaggi e la preparazione delle soluzioni di riferimento devono essere ad elevato grado di purezza.

6.1 *Acido nitrico concentrato (d=1,40)*

6.2 *Soluzione concentrata di cobalto (1000 mg/L)*

Si consiglia di utilizzare soluzioni di riferimento ad elevato grado di purezza disponibili in commercio.

6.3 Soluzione diluita di cobalto (2,0 mg/L)

Trasferire 200 µL della soluzione (6.2) in pallone tarato da 100 mL, aggiungere 1 mL di HNO_3 (6.1) e portare a volume con acqua ad elevato grado di purezza. Questa soluzione è stabile per almeno un mese se conservata a 4°C in un contenitore caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli (polietilene o policarbonato) e opportunamente chiuso in modo da evitare sia l'evaporazione del solvente che eventuali contaminazioni.

6.4 Modificatore di matrice $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$

Sciogliere 0,3455 g di $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ di grado ultrapuro in acqua deionizzata e portare a volume in matraccio tarato da 100 mL in polietilene. È possibile utilizzare anche altri modificatori seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento.

7. Procedimento

7.1 Ottimizzazione dei parametri strumentali

Per migliorare le prestazioni analitiche dell'apparecchiatura e per minimizzare eventuali interferenze, procedere all'ottimizzazione dei parametri strumentali seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento o in altri protocolli standardizzati. In Tabb. 1-2 sono elencate, a titolo di esempio, le condizioni operative tipiche per l'esecuzione delle analisi.

Tabella 1: Condizioni operative strumentali

Lunghezza d'onda (nm)	240,7
Fenditura (nm)	0,2
Rilevazione del segnale	altezza o area del picco
Correzione del fondo	attivata
Tubo	pirolitico
Intensità di corrente della lampada (mA)	come da specifica
Volume del campione (µL)	25
Volume del modificante di matrice (µL)	25

Tabella 2: Programma termico

	T°C	RT	HT	G	R
Essiccamento	120	20	20	300	
Incenerimento	1100	40	20	300	
Atomizzazione	2400	0	5	0	*
Pulizia	2600	1	5	300	

RT = tempo in secondi della rampa di temperatura
HT = tempo in secondi di permanenza alla temperatura impostata (isoterma)
T°C = temperatura impostata in °C
G = flusso del gas di lavaggio (argon ultrapuro) in mL/minuto
R = attivazione della lettura in atomizzazione.

Il ciclo elettrotermico riportato è valido nel caso in cui si utilizzi un tubo di grafite pirolitica; in tutti gli altri casi andrà ottimizzato, prendendo come riferimento quello generalmente consigliato dal manuale d'uso fornito a corredo dell'apparecchiatura.

7.2 Analisi

7.2.1 Determinazione diretta

Dopo aver impostato i parametri strumentali come descritto in (7.1), costruire la curva di taratura utilizzando almeno tre soluzioni di riferimento scelte nel campo di indagine analitico, preparate diluendo opportunamente la soluzione (6.3), e il bianco dei reattivi. Ripetere la misura di ogni soluzione di riferimento compreso il bianco almeno tre volte.
Quindi, eseguire l'analisi dei campioni effettuando almeno tre letture per ogni soluzione da analizzare; si considerano accettabili i valori che forniscono un coefficiente di variazione inferiore al 10%. Le analisi dei campioni, delle soluzioni di riferimento e del bianco dei reattivi devono essere effettuate nelle stesse condizioni strumentali. Se la risposta del campione incognito analizzato cade al di fuori dell'intervallo di linearità, diluire opportunamente il campione per riportarlo nel campo di linearità. Qualora risulti necessaria una diluizione del campione talmente elevata da esaltare gli errori connessi alla suddetta operazione è preferibile ripetere sia la taratura che l'analisi riducendo la quantità di campione iniettato nel fornetto di grafite oppure aumentando il flusso di gas di lavaggio in atomizzazione.
Nel caso in cui sia richiesta l'analisi di un numero notevole di campioni si consiglia di controllare la taratura inserendo ogni cinque campioni una soluzione di controllo utilizzata per la taratura e verificando che il valore di quest'ultima risulti entro il ±5% del valore atteso.

7.2.2 Metodo delle aggiunte note

Il campione viene suddiviso in quattro aliquote, di cui una rimane tal quale, mentre alle altre si aggiungono concentrazioni crescenti dell'analita dello stesso ordine di grandezza di quella attesa per il campione. Misurare l'assorbanza delle quattro soluzioni e del bianco dei reattivi seguendo le indicazioni riportate al Paragrafo 7.1, avendo cura di ripetere le misure almeno tre volte. La concentrazione totale di cobalto presente nelle aliquote non deve superare il valore limite oltre il quale la risposta strumentale non è più lineare.

8. Calcoli

8.1 Determinazione diretta

La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le concentrazioni (µg/L) delle soluzioni di riferimento in ascissa e le assorbanze corrispondenti, corrette del bianco, in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%. Calcolare quindi la concentrazione del cobalto nel campione utilizzando l'equazione ottenuta dalla regressione lineare, tenendo conto dell'eventuale diluizione effettuata.

8.2 Metodo delle aggiunte

Siano C_1, C_2, C_3, rispettivamente le concentrazioni corrispondenti alla 1ª, 2ª, 3ª aggiunta e A_0, A_1, A_2, A_3, le assorbanze del campione (A_0) e del campione addizionato delle varie aggiunte, sottratte del bianco dei reattivi. Calcolare la retta di regressione che interpola i valori di assorbanza in funzione delle concentrazioni aggiunte, attribuendo al campione incognito di assorbanza A_0 una concentrazione "aggiunta" uguale a zero. La concentrazione incognita riferita al campione sarà data dal valore dell'intercetta sull'asse (x) cambiato di segno. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%.

9. Qualità del dato

Prove effettuate (n=5) da tre laboratori su soluzioni sintetiche di acqua deionizzata contenenti 5,0 µg/L e 40,0 µg/L di cobalto hanno fornito valori del coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100, pari, rispettivamente, a 2,3% e 0,2%.
Va tenuto presente che la precisione di un metodo generalmente peggiora all'aumentare della complessità della matrice. Su campioni di acque di scarico, ad una concentrazione di 29,7 µg/L lo Standard Methods riporta una riproducibilità del 18% ed un'accuratezza del 6%.

Nota: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico". Caratterizzato il materiale di riferimento non certificato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, è possibile verificare gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.*

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA), 3-24/3-31.

EPRI (Electric Power Research Institute) (1988): "*Round Robin Study of Methods for Trace Metal Analysis. Volume 1-2 Atomic Absorption Spetroscopy*", Palo Alto, California CS-5910 Project 1851-1 Final Report, August.

IRSA (1986 a): "I metalli nelle acque: origine, distribuzione, metodi di rimozione", Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **71**, 21-22.

IRSA (1986 b): "Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **75**, 263-278.

LETOURNAUS V.A., JOSHI B.M. & BUTLER L.C. (1987): "Comparison between Zeeman and continuum background correction for graphite furnace AAS on environmental samples", *At. Spectrosc.*, **8**, (5), 145-149.

PERKIN-ELMER (1984): "*Analytical Methods for Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*", Publication B332, Uberlingen, FRG.

SLAVIN W. (1984): "*Graphite Furnace AAS Source Book*", the Perkin-Elmer Corporation Norwalk, 97-99.

UNICHIM (1996): "*Linee Guida per la taratura della strumentazione analitica – Spettrometri di assorbimento atomico ad atomizzazione elettrotermica (EAAS)*", Manuale 177/2, Milano.

WES T.S. (1988): "*The Determination of Trace Metals in Natural Waters*", The late H.W. Numberg, IUPAC, Blackwell Scientific Publication, London.

3150. Cromo

Il cromo è presente, nei minerali conosciuti, sempre allo stato trivalente se si escludono i rarissimi rinvenimenti di cromati, come ad esempio la crocoite ($PbCrO_4$). Il suo minerale più diffuso è la cromite ed è anche presente in piccole quantità in molti silicati. Il tenore medio del cromo nella crosta terrestre è di circa 100 ppm. Nelle acque dolci e marine incontaminate si assume per il cromo una concentrazione media di riferimento di 0,2 µg/L. Il cromo ha impieghi principali in siderurgia, galvanica, industria chimica (catalizzatori, coloranti, fungicidi), medicina (isotopo radiattivo), concia delle pelli, mordenzatura e stampa dei tessuti, fotografia e litografia, produzione di abrasivi, refrattari per altoforni. Il cromo può esistere in nove stadi di ossidazione (da - II a + VI). La forma anionica Cr(VI) è debolmente adsorbita dal materiale particellato, ed è quindi più mobile del Cr(III). Negli ambienti acquatici, la forma esavalente è più tossica di quella trivalente. La tossicità del Cr(III) diminuisce all'aumentare della durezza dell'acqua, mentre quella del Cr(VI) è influenzata oltre che dalla durezza dell'acqua anche dalla concentrazione del solfato, che è in grado di competere con il cromato.
Il cromo (III) e il cromo (VI) rappresentano gli stati di ossidazione più comuni. Poiché ai due diversi stati di ossidazione corrispondono comportamenti ambientali molto differenti, le normative prevedono, in taluni casi, limiti differenziati per le due forme.
Il D.Lgs. 152/99 in materia di tutela delle acque dall'inquinamento fissa criteri di qualità diversificati per i due stati di ossidazione (50 µg/L per Cr(III)+Cr (VI) e 5 µg/L per il Cr(VI) per le acque sotterranee) mentre per le acque superficiali destinate alla potabilizzazione il limite è di 50 µg/L senza alcuna specifica per lo stato di ossidazione. Per le acque idonee alla vita dei pesci, limitatamente alla specie più esigente, i salmonidi, sono previsti per il cromo criteri compresi tra 5 e 50 µg/L, in funzione della durezza dell'acqua. Il D.Lgs. 31/2001 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano fissa una concentrazione massima ammissibile di 50 µg/L.
Al fine di soddisfare le esigenze normative, nel seguito vengono proposti metodi diretti per eseguire separatamente ciascuna delle due determinazioni, anche se nella pratica comune si ricorre spesso a metodi indiretti per differenza, basati sulla determinazione del cromo totale e di una delle due forme. Se si vuole procedere a determinazioni specifiche dei due stati di ossidazione il campione, filtrato o meno, non dovrà essere acidificato ma lasciato al suo pH naturale poiché eventuali modifiche di tale parametro potrebbero alterare la distribuzione del cromo tra le due forme.
I procedimenti analitici, descritti nel seguito, possono essere così riassunti:
Il *cromo totale disciolto* può essere determinato direttamente nel campione mediante spettrometria di assorbimento atomico in fiamma (metodo A) oppure mediante assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica (metodo B1); oppure per bassi livelli di concentrazione o per matrici complesse (es. acque marine) può essere determinato previa concentrazione dell'analita mediante coprecipitazione con idrossido ferrico ed analisi in assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica (metodo B4).
Il *cromo (VI)* può essere determinato direttamente nel campione mediante la misura spettrofotometrica dell'assorbanza del composto che esso forma con la difenilcarbazide (metodo C1) oppure mediante spettrometria di assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica, previa estrazione con APDC (metodo B2).
Il *cromo (III)* può essere determinato mediante spettrometria di assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica (metodo B3), dopo allontanamento del cromo (VI) mediante estrazione con APDC.

METODO A - Determinazione del cromo totale per spettrometria di assorbimento atomico con atomizzazione in fiamma (F-AAS)

1. Principio del metodo

Il cromo viene determinato per aspirazione diretta del campione nella fiamma (aria-acetilene) di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico. Dalla misura del segnale di assorbanza a 357,9 nm si ricava la concentrazione mediante confronto con una curva di taratura ottenuta con soluzioni a concentrazioni note di analita, tali che comprendano il campione incognito analizzato.

2. Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione del cromo in campioni di acque naturali e di scarico nell'intervallo di concentrazione da 0,1 a 4,0 mg/L. Per concentrazioni superiori a 4 mg/L è possibile rientrare nell'intervallo indicato ricorrendo alla diluizione del campione oppure facendo ricorso ad una lunghezza d'onda meno sensibile, prendendo come riferimento quelle generalmente consigliate dal manuale d'uso fornito a corredo dell'apparecchiatura.
Effettuando 10 determinazioni su uno stesso campione avente un contenuto di cromo pari a 0,1 mg/L, alternate con una misura del bianco, si è potuto calcolare un limite di rivelabilità, espresso come tre volte lo scarto tipo, di 0,01 mg/L.

3. Interferenze e cause di errore

L'utilizzo del correttore di fondo consente di minimizzare gli assorbimenti aspecifici eventualmente presenti. Nel caso in cui si debba determinare l'analita in una matrice sconosciuta o scarsamente caratterizzata è consigliabile ricorrere al metodo delle aggiunte note. Tale metodo permette di minimizzare le interferenze di matrice di tipo fisico e/o chimico (variazioni di densità, viscosità, tensione superficiale) eventualmente presenti.
Alte concentrazioni di ferro e nichel provocano interferenza negativa. L'aggiunta di NH_4Cl al 2% alle soluzioni di riferimento, ai campioni e al bianco dei reattivi permette di controllare l'interferenza. Inoltre l'utilizzo di una fiamma riducente permette di ottenere una retta di taratura lineare ed indipendente dallo stato di ossidazione del cromo in soluzione.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". Si consiglia di conservare i campioni in bottiglie di polipropilene, o altro materiale caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli, precedentemente trattate con HNO_3 1 M per una notte e successivamente neutralizzate con acqua ad elevato grado di purezza. Per determinare soltanto il cromo totale (III+VI) disciolto, il campione viene filtrato dopo il prelievo su membrana da 0,45 μm (acetato di cellulosa o policarbonato) e acidificato fino a pH<2 con HNO_3 (6.1). L'analisi deve essere effettuata prima possibile e comunque il campione acidificato rimane stabile per almeno una settimana dal prelievo. Per la determinazione quantitativa del cromo totale $[(III+VI)_{disciolto}+(III+VI)_{particolato}]$ si rimanda alle Sezioni 3000 e 3010.

5. Apparecchiature

5.1 Spettrofotometro di assorbimento atomico, corredato di bruciatore standard per aria-acetilene e di dispositivo per la correzione degli assorbimenti aspecifici.

5.2 Lampada a catodo cavo o altra sorgente luminosa capace di emettere lo spettro dell'elemento in esame.

6. Reattivi

Tutti i reattivi e l'acqua utilizzata per i lavaggi e la preparazione delle soluzioni di riferimento devono essere ad elevato grado di purezza.

6.1 Acido nitrico concentrato (d=1,40)

6.2 Soluzione concentrata di cromo (1000 mg/L)

Si consiglia di utilizzare soluzioni di riferimento ad elevato grado di purezza disponibili in commercio.

6.3 Soluzione diluita di cromo (10,0 mg/L)

Trasferire 1,0 mL della soluzione (6.2) in pallone tarato da 100 mL, aggiungere 1 mL di HNO_3 (6.1) e portare a volume con acqua ad elevato grado di purezza. Questa soluzione è stabile per almeno un mese se conservata a 4°C in un contenitore caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli (polietilene o policarbonato) e opportunamente chiuso in modo da evitare sia l'evaporazione del solvente che eventuali contaminazioni.

7. Procedimento

7.1 Ottimizzazione dei parametri strumentali

Per migliorare le prestazioni analitiche dell'apparecchiatura e per minimizzare eventuali interferenze, procedere all'ottimizzazione dei parametri strumentali seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento o in altri protocolli standardizzati. In Tab. 1 sono elencate, a titolo di esempio, le condizioni operative tipiche per l'esecuzione delle analisi.

Tabella 1: Condizioni operative strumentali	
Lunghezza d'onda (nm)	357,9
Fenditura (nm)	0,7
Correzione del fondo	attivata
Fiamma	aria-acetilene
Intensità di corrente della lampada (mA)	come da specifica

7.2 Analisi

7.2.1 Determinazione diretta

Dopo aver impostato i parametri strumentali come descritto in (7.1), costruire la curva di taratura utilizzando almeno tre soluzioni di riferimento preparate diluendo opportunamente la soluzione (6.3), in modo tale da coprire l'intero campo di indagine analitico, e il bianco dei reattivi. Ripetere la misura di ogni soluzione di riferimento compreso il bianco almeno tre volte.
Quindi, eseguire l'analisi dei campioni effettuando almeno tre letture per ogni soluzione da analizzare; si considerano accettabili i valori che forniscono un coefficiente di variazione in-

feriore al 5%. Le analisi dei campioni, delle soluzioni di riferimento e del bianco dei reattivi devono essere effettuate nelle stesse condizioni strumentali. Se la risposta del campione incognito analizzato cade al di fuori dell'intervallo di linearità diluire opportunamente il campione per riportarlo nel campo di linearità. Qualora risulti necessaria una diluizione del campione talmente elevata da esaltare gli errori connessi alla suddetta operazione è preferibile ripetere sia la taratura che l'analisi ricorrendo ad un'altra riga analitica meno sensibile.
Nel caso in cui sia richiesta l'analisi di un numero notevole di campioni si consiglia di controllare la taratura inserendo ogni cinque campioni una soluzione di controllo utilizzata per la taratura e verificando che il valore di quest'ultima risulti entro il ±5% del valore atteso.

7.2.2 Metodo delle aggiunte note

Il campione viene suddiviso in quattro aliquote, di cui una rimane tal quale, mentre alle altre si aggiungono concentrazioni crescenti dell'analita dello stesso ordine di grandezza di quella attesa per il campione. Misurare l'assorbanza delle quattro soluzioni e del bianco dei reattivi seguendo le indicazioni riportate al Paragrafo 7.1, avendo cura di ripetere le misure almeno tre volte. La concentrazione totale di cromo presente nelle aliquote deve comunque essere inferiore al valore limite oltre il quale la risposta strumentale non è più lineare.

8. Calcoli

8.1 Determinazione diretta

La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le concentrazioni (mg/L) delle soluzioni di riferimento in ascissa e le assorbanze corrispondenti, corrette del bianco, in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%. Calcolare quindi la concentrazione del cromo nel campione utilizzando l'equazione ottenuta dalla regressione lineare, tenendo conto dell'eventuale diluizione effettuata.

8.2 Metodo delle aggiunte

Siano C_1, C_2, C_3, rispettivamente le concentrazioni corrispondenti alla 1ª, 2ª, 3ª aggiunta e A_0, A_1, A_2, A_3, le assorbanze del campione (A_0) e del campione addizionato delle varie aggiunte, sottratte del bianco dei reattivi. Calcolare la retta di regressione che interpola i valori di assorbanza in funzione delle concentrazioni aggiunte, attribuendo al campione incognito di assorbanza A_0 una concentrazione "aggiunta" uguale a zero. La concentrazione incognita riferita al campione sarà data dal valore dell'intercetta sull'asse (x) cambiato di segno. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%.

9. Qualità del dato

Prove effettuate in quintuplicato da tre laboratori su campioni di acque di scarico, dopo l'aggiunta di quantità note di cromo in modo da ottenere una concentrazione di 2,0 mg/L hanno fornito un valore del coefficiente di variazione, [CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100], pari al 10% ed un'accuratezza del 10%.
Non essendo stati utilizzati materiali di riferimento, l'accuratezza va intesa come grado di accordo tra il risultato della misurazione e il valore di riferimento accettato.
Per acque di scarico, dopo aggiunta di quantità note di cromo tali da realizzare una concentrazione finale di 3 mg/L, lo Standard Methods riporta una riproducibilità del 10,0% ed un'accuratezza del 3,7%.

Nota: s*i consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recen-*

ti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".
Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

METODO B1 - Determinazione del cromo totale per spettrometria di assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica (ETA-AAS)

1. Principio del metodo

Il cromo viene determinato per iniezione diretta del campione nel fornetto di grafite di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico. Dalla misura del segnale di assorbanza a 357,9 nm si ricava la concentrazione mediante confronto con una curva di taratura ottenuta con soluzioni a concentrazioni note di analita, comprese nel campo di indagine analitico.

2. Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione del cromo in campioni di acque naturali e di scarico nell'intervallo di concentrazione da 1,0 a 20,0 µg/L. Per concentrazioni superiori a 20 µg/L è possibile rientrare nell'intervallo indicato ricorrendo alla diluizione del campione.
Effettuando 10 determinazioni su uno stesso campione avente un contenuto di cromo pari a 1,0 µg/L, alternate con una misura del bianco, si è potuto calcolare un limite di rivelabilità, espresso come tre volte lo scarto tipo, di 0,2 µg/L (volume iniettato: 50 µL di campione). Tale limite dipende dalla matrice e dalle condizioni strumentali applicate; può essere migliorato aumentando il volume di campione iniettato. Tuttavia applicando queste modalità vengono esaltati gli effetti delle specie interferenti.

3. Interferenze e cause di errore

L'utilizzo del correttore di fondo consente di minimizzare gli assorbimenti aspecifici eventualmente presenti. Nel caso in cui si debba determinare l'analita in una matrice sconosciuta o scarsamente caratterizzata è consigliabile ricorrere al metodo delle aggiunte note. Tale metodo permette di minimizzare le interferenze di tipo fisico e/o chimico eventualmente presenti.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". In particolare, considerando le basse concentrazioni da determinare, si consiglia di conservare i campioni in bottiglie di polipropilene o altro materiale caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli, precedentemente trattate con HNO_3 1 M per una notte e successivamente neutralizzate con acqua ad elevato grado di purezza. Per determinare soltanto il cromo totale (III+VI) disciolto, il campione viene filtrato dopo il prelievo su membrana da 0,45 µm (acetato di cellulosa o policarbonato) e acidificato fino a pH<2 con HNO_3 (6.1). L'analisi deve essere effettuata prima possibile e comunque il campione acidificato rimane stabile per almeno una settimana dal prelievo. Per la determinazione quantitativa del cromo totale $[(III+VI)_{disciolto}+(III+VI)_{particolato}]$ si rimanda alle Sezioni 3000 e 3010.

È buona norma considerare sempre l'opportunità di predisporre un "bianco di campo", ottenuto semplicemente mediante lo stoccaggio di un'aliquota di acqua ultrapura in un recipiente identico a quello dei prelievi, da sottoporre successivamente a tutte le fasi analitiche previste per i campioni. Altri sistemi di controllo della qualità del campionamento consistono nell'uso di campioni replicati, nell'attivazione di precauzioni per proteggere i campioni in modo da evitare qualsiasi possibile contaminazione, nell'avvinamento regolare dei recipienti.

5. Apparecchiature

5.1 Spettrofotometro di assorbimento atomico, corredato di fornetto di grafite e di dispositivo per la correzione degli assorbimenti aspecifici.

5.2 Lampada a catodo cavo o altra sorgente luminosa capace di emettere lo spettro dell'elemento in esame.

5.3 Autocampionatore oppure micropipette tarate per il dosaggio di pochi µL.

5.4 Dispositivo per la registrazione dell'assorbanza, adatto ad evidenziare la forma del picco.

5.5 Dispositivo che fornisce argon ultrapuro

6. Reattivi

Tutti i reattivi e l'acqua utilizzata per i lavaggi e la preparazione delle soluzioni di riferimento devono essere ad elevato grado di purezza.

6.1 Acido nitrico concentrato (d= 1,40)

6.2 Soluzione concentrata di cromo (1000 mg/L)

Si consiglia di utilizzare soluzioni di riferimento ad elevato grado di purezza disponibili in commercio.

6.3 Soluzione diluita di cromo (2,0 mg/L)

Trasferire 200 µL della soluzione (6.2) in pallone tarato da 100 mL, aggiungere 1 mL di HNO_3 (6.1) e portare a volume con acqua ad elevato grado di purezza. Questa soluzione è stabile per almeno un mese se conservata a 4°C in un contenitore caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli (polietilene o policarbonato) e opportunamente chiuso in modo da evitare sia l'evaporazione del solvente che eventuali contaminazioni.

7. Procedimento

7.1 Ottimizzazione dei parametri strumentali

Per migliorare le prestazioni analitiche dell'apparecchiatura e per minimizzare eventuali interferenze, procedere all'ottimizzazione dei parametri strumentali seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento o in altri protocolli standardizzati. In Tabb. 1-2 sono elencate, a titolo di esempio, le condizioni operative tipiche per l'esecuzione delle analisi.

Tabella 1: Condizioni operative strumentali	
Lunghezza d'onda (nm)	357,9
Fenditura (nm)	0,7
Rilevazione del segnale	altezza o area del picco
Correzione del fondo	attivata
Tubo	pirolitico
Intensità di corrente della lampada (mA)	come da specifica
Volume del campione (µL)	50

Tabella 2: Programma termico

	T°C	RT	HT	G	R
Essiccamento	120	20	20	300	
Incenerimento	1200	40	20	300	
Atomizzazione	2400	0	5	0	*
Pulizia	2600	1	5	300	

RT = tempo in secondi della rampa di temperatura
HT = tempo in secondi di permanenza alla temperatura impostata (isoterma)
T°C = temperatura impostata in °C
G = flusso del gas di lavaggio (argon ultrapuro) in mL/minuto
R = attivazione della lettura in atomizzazione.

Il ciclo elettrotermico riportato è valido nel caso in cui si utilizzi un tubo di grafite pirolitica; in tutti gli altri casi andrà ottimizzato, prendendo come riferimento quello generalmente consigliato dal manuale d'uso fornito a corredo dell'apparecchiatura.

7.2 Analisi

7.2.1 Determinazione diretta

Dopo aver impostato i parametri strumentali come descritto in (7.1), costruire la curva di taratura utilizzando almeno tre soluzioni di riferimento scelte nel campo di indagine analitico, preparate diluendo opportunamente la soluzione (6.3), e il bianco dei reattivi. Ripetere la misura di ogni soluzione di riferimento compreso il bianco almeno tre volte.
Quindi, eseguire l'analisi dei campioni effettuando almeno tre letture per ogni soluzione da analizzare; si considerano accettabili i valori che forniscono un coefficiente di variazione inferiore al 10%. Le analisi dei campioni, delle soluzioni di riferimento e del bianco dei reattivi devono essere effettuate nelle stesse condizioni strumentali. Se la risposta del campione incognito analizzato cade al di fuori dell'intervallo di linearità, diluire opportunamente il campione per riportarlo nel campo di linearità. Qualora risulti necessaria una diluizione del campione talmente elevata da esaltare gli errori connessi alla suddetta operazione è preferibile ripetere sia la taratura che l'analisi riducendo la quantità di campione iniettato nel fornetto di grafite oppure aumentando il flusso di gas di lavaggio in atomizzazione.
Nel caso in cui sia richiesta l'analisi di un numero notevole di campioni si consiglia di controllare la taratura inserendo ogni cinque campioni una soluzione di controllo utilizzata per la taratura e verificando che il valore di quest'ultima risulti entro il ±5% del valore atteso.

7.2.2 Metodo delle aggiunte note

Il campione viene suddiviso in quattro aliquote, di cui una rimane tal quale, mentre alle altre si aggiungono concentrazioni crescenti dell'analita dello stesso ordine di grandezza di quella attesa per il campione. Misurare l'assorbanza delle quattro soluzioni e del bianco dei reattivi seguendo le indicazioni riportate al Paragrafo 7.1, avendo cura di ripetere le misure almeno tre volte. La concentrazione totale di cromo presente nelle aliquote non deve superare il valore limite oltre il quale la risposta strumentale non è più lineare.

8. Calcoli

8.1 Determinazione diretta

La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le concentrazioni (µg/L) delle soluzioni di riferimento in ascissa e le assorbanze corrispondenti, corrette del bianco, in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%. Calcolare quindi la concentrazione del cromo nel campione utilizzando l'equazione ottenuta dalla regressione lineare, tenendo conto dell'eventuale diluizione effettuata.

8.2 Metodo delle aggiunte

Siano C_1, C_2, C_3, rispettivamente le concentrazioni corrispondenti alla 1ª, 2ª, 3ª aggiunta e A_0, A_1, A_2, A_3, le assorbanze del campione (A_0) e del campione addizionato delle varie aggiunte, sottratte del bianco dei reattivi. Calcolare la retta di regressione che interpola i valori di assorbanza in funzione delle concentrazioni aggiunte, attribuendo al campione incognito di assorbanza A_0 una concentrazione "aggiunta" uguale a zero. La concentrazione incognita riferita al campione sarà data dal valore dell'intercetta sull'asse (x) cambiato di segno. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%.

9. Qualità del dato

Prove effettuate in quintuplicato, in un circuito di interconfronto, su soluzioni sintetiche in acqua deionizzata hanno fornito, dopo eliminazione di eventuali "outlier", i seguenti risultati:

Concentrazione attesa (µg/L)	5,0	10,0
Concentrazione trovata (µg/L)*	48 ± 0,3	9,6 ± 0,4
Numero di laboratori (n)	7	7
Ripetibilità (r%)	9,7	3,8
Riproducibilità (R%)	14,6	11,5
Accuratezza (%)**	4,0	4,0

** valor medio ± scarto tipo*

S(r)= scarto tipo di ripetibilità; S(R)= scarto tipo di riproducibilità

$r = 2\cdot(2)^{1/2}\cdot S(r) = 2{,}83\cdot S(r)$; $R = 2\cdot(2)^{1/2}\cdot S(R) = 2{,}83\cdot S(R)$

*** Non essendo stati utilizzati materiali di riferimento, l'accuratezza va intesa come grado di accordo tra il risultato della misurazione e il valore di riferimento accettato.*

Va tenuto presente che la precisione e accuratezza di un metodo generalmente peggiorano all'aumentare della complessità della matrice. Su campioni di acque di scarico, ad una concentrazione di 9,87 µg/L lo Standard Methods riporta una riproducibilità del 41% ed un'accuratezza del 5%.

Nota: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".*
Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

METODO B2 - Determinazione del cromo (VI). Metodo per spettrometria di assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica, previa estrazione del complesso APDC–cromo (VI)

1. Principio del metodo

La formazione del composto APDC–cromo (VI) permette l'estrazione selettiva in cloroformio del cromo (VI) rispetto al cromo (III). La successiva distruzione del complesso organico e la solubilizzazione del cromo (VI) in soluzione acquosa consente la determinazione del cromo (VI) per iniezione diretta nel fornetto di grafite di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico. In tale maniera vengono eliminati quegli inconvenienti che di solito si verificano immettendo solventi organici direttamente nel fornetto. Dalla misura del segnale di assorbanza a 357,9 nm si ricava la concentrazione mediante confronto con una curva di taratura ottenuta con soluzioni a concentrazioni note di analita, comprese nel campo di indagine analitico.

2. Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione del cromo (VI) in campioni di acque naturali e di scarico nell'intervallo di concentrazione da 0,1 a 2 µg/L. Per concentrazioni superiori a 2 µg/L è possibile rientrare nell'intervallo indicato ricorrendo alla diluizione del campione.
Effettuando 10 determinazioni su uno stesso campione avente un contenuto di cromo pari a 0,1 µg/L, alternate con una misura del bianco, si è potuto calcolare un limite di rivelabilità, espresso come tre volte lo scarto tipo, di 0,02 µg/L (volume iniettato: 50 µL di campione). Tale limite dipende dalla matrice e dalle condizioni strumentali applicate; può essere migliorato aumentando il volume di campione iniettato. Tuttavia applicando queste modalità vengono esaltati gli effetti delle specie interferenti.

3. Interferenze e cause di errore

L'utilizzo del correttore di fondo consente di minimizzare gli assorbimenti aspecifici eventualmente presenti. Nel caso in cui si debba determinare l'analita in una matrice sconosciuta o scarsamente caratterizzata è consigliabile ricorrere al metodo delle aggiunte note. Tale metodo permette di minimizzare le interferenze di matrice di tipo fisico e/o chimico eventualmente presenti.
Il metodo non è inficiato da interferenze importanti perché il cromo (VI) viene separato selettivamente dal cromo (III) e vengono eliminate perturbazioni del segnale da parte di matrici complesse. Il metodo può essere affetto da errori in difetto se nel campione sono presenti elevate concentrazioni di elementi (Cd, Co, Cu, Fe, Pb, Mn, Ni, Ag, e Zn), che formano complessi con l'APDC.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". Si consiglia di conservare i campioni in bottiglie di polipropilene, o altro materiale caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli, precedentemente trattate con HNO_3 1 M per una notte e successivamente neutralizzate con acqua ad elevato grado di purezza. Per determinare soltanto il cromo (VI) disciolto, il campione viene filtrato dopo il prelievo su membrana da 0,45 µm (acetato di cellulosa o policarbonato) e sottoposto al trattamento di estrazione. L'analisi deve essere effettuata prima possibile dal momento del prelievo per prevenire reazioni di ossido-riduzione.
È buona norma considerare sempre l'opportunità di predisporre un "bianco di campo", ottenuto semplicemente mediante lo stoccaggio di un'aliquota di acqua ultrapura in un recipien-

te identico a quello dei prelievi, da sottoporre successivamente a tutte le fasi analitiche previste per i campioni. Altri sistemi di controllo della qualità del campionamento consistono nell'uso di campioni replicati, nell'attivazione di precauzioni per proteggere i campioni in modo da evitare qualsiasi possibile contaminazione, nell'avvinamento regolare dei recipienti.

5. Apparecchiature

5.1 Spettrofotometro di assorbimento atomico, corredato di fornetto di grafite e di dispositivo per la correzione degli assorbimenti aspecifici.

5.2 Lampada a catodo cavo o altra sorgente luminosa capace di emettere lo spettro dell'elemento in esame.

5.3 Autocampionatore oppure micropipette tarate per il dosaggio di pochi µL.

5.4 Dispositivo per la registrazione dell'assorbanza, adatto ad evidenziare la forma del picco.

5.5 Dispositivo che fornisce argon ultrapuro

5.6 Serie di imbuti separatori, possibilmente in vetro Pyrex da 1 L precedentemente lavati come descritto nel Capitolo 4.

6. Reattivi

Tutti i reattivi e l'acqua utilizzata per i lavaggi e la preparazione delle soluzioni di riferimento devono essere ad elevato grado di purezza.

6.1 Acido nitrico concentrato (d=1,40)

6.2 Soluzione concentrata di cromo (VI) (1000 mg/L)

Si consiglia di utilizzare soluzioni di riferimento ad elevato grado di purezza disponibili in commercio.

6.3 Soluzione diluita di cromo (VI) (2,0 mg/L)

Trasferire 200 µL della soluzione (6.2) in pallone tarato da 100 mL, aggiungere 1 mL di HNO_3 (6.1) e portare a volume con acqua ad elevato grado di purezza. Questa soluzione è stabile per almeno un mese se conservata a 4°C in un contenitore caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli (polietilene o policarbonato) e opportunamente chiuso in modo da evitare sia l'evaporazione del solvente che eventuali contaminazioni.

6.4 Cloroformio ($CHCl_3$, d=1,48) ad elevato grado di purezza.

6.5 Soluzione di Ammonio Pirrolidinditiocarbammato (APDC) all'1%

Sciogliere 1 g di APDC in 100 mL di acqua. La soluzione, che ha un aspetto opalescente, è stabile per un tempo brevissimo e va quindi preparata nella quantità necessaria, al momento dell'uso. La soluzione, prima di essere adoperata, va estratta, almeno tre volte, con cloroformio (6.4) per eliminare impurezze metalliche presenti.

6.6 Ammoniaca concentrata (d=0,8)

6.7 Acido cloridrico concentrato (d=1,19)

6.8 Acido acetico glaciale (CH_3COOH, d=1,05) ad elevato grado di purezza.

6.9 Acetato di ammonio (CH_3COONH_4) ad elevato grado di purezza.

6.10 Soluzione tampone di acido acetico-acetato di ammonio

Sciogliere 250 g di acetato d'ammonio (6.9) in 150 mL di acqua e aggiungere 600 mL di acido acetico (6.8). La soluzione può essere trattata in imbuto separatore da 1 L con 7 mL di APDC e 40 mL di cloroformio (6.4) allo scopo di estrarre e allontanare con la fase organica le impurezze di metalli presenti nei reattivi.

7. Procedimento

7.1 Preparazione del campione

È opportuno trattare contemporaneamente almeno 3 campioni (per acque marine non devono essere dissimili in termini di salinità per più del 5‰).
Trasferire 500 mL di campione in imbuto separatore da 1 L, aggiustare il pH a 4-5 con soluzioni diluite di acido cloridrico (6.7) o ammoniaca (6.6). Aggiungere, successivamente, la soluzione tampone (6.10), 5 mL di APDC all'1% (6.5) e 20 mL di cloroformio (6.4). Agitare per 2 minuti, quindi lasciare stratificare. Quando le fasi si sono separate, recuperare separatamente lo strato inferiore acquoso (servirà per la preparazione del bianco e dei riferimenti) e raccogliere interamente lo strato organico in un secondo imbuto separatore da 100 mL contenente 10 mL di HNO_3 5 M. Ripetere l'estrazione per ciascun campione con 20 mL di cloroformio come descritto in precedenza avendo cura di unire lo strato organico a quello precedente nell'imbuto separatore da 100 mL. Quindi procedere all'estrazione di ritorno in ambiente acido agitando per 2 minuti l'imbuto separatore da 100 mL e lasciando stratificare. Quando le fasi si sono separate, recuperare la fase acquosa in matraccio di polietilene da 25 mL e portare a volume con acqua.

7.2 Ottimizzazione dei parametri strumentali

Per migliorare le prestazioni analitiche dell'apparecchiatura e per minimizzare eventuali interferenze, procedere all'ottimizzazione dei parametri strumentali seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento o in altri protocolli standardizzati. In Tabb. 1-2 sono elencate, a titolo di esempio, le condizioni operative tipiche per l'esecuzione delle analisi.

Tabella 1: Condizioni operative strumentali	
Lunghezza d'onda (nm)	357,9
Fenditura (nm)	0,7
Rilevazione del segnale	altezza o area del picco
Correzione del fondo	attivata
Tubo	pirolitico
Intensità di corrente della lampada (mA)	come da specifica
Volume del campione (µL)	50

Il ciclo elettrotermico riportato è valido nel caso in cui si utilizzi un tubo di grafite pirolitica; in tutti gli altri casi andrà ottimizzato, prendendo come riferimento quello generalmente consigliato dal manuale d'uso fornito a corredo dell'apparecchiatura.

Tabella 2: Programma termico

	T°C	RT	HT	G	R
Essiccamento	120	20	20	300	
Incenerimento	1200	40	20	300	
Atomizzazione	2400	0	5	0	*
Pulizia	2600	1	5	300	

RT = tempo in secondi della rampa di temperatura
HT = tempo in secondi di permanenza alla temperatura impostata (isoterma)
T°C = temperatura impostata in °C
G = flusso del gas di lavaggio (argon ultrapuro) in mL/minuto
R = attivazione della lettura in atomizzazione.

7.3 Analisi

7.3.1 Determinazione diretta

Dopo aver impostato i parametri strumentali come descritto in (7.2), costruire la curva di taratura utilizzando almeno tre soluzioni di riferimento e il bianco dei reattivi sottoposti allo stesso trattamento seguito per il campione; le soluzioni vanno preparate diluendo opportunamente la soluzione (6.3), in modo tale da coprire l'intero campo di indagine analitico. Ripetere la misura di ogni soluzione di riferimento compreso il bianco almeno tre volte.
Quindi, eseguire l'analisi dei campioni effettuando almeno tre letture per ogni soluzione da analizzare; si considerano accettabili i valori che forniscono un coefficiente di variazione inferiore al 10%. Le analisi dei campioni, delle soluzioni di riferimento e del bianco dei reattivi devono essere effettuate nelle stesse condizioni strumentali. Se la risposta del campione incognito analizzato cade al di fuori dell'intervallo di linearità diluire opportunamente il campione per riportarlo nel campo di linearità. Qualora risulti necessaria una diluizione del campione talmente elevata da esaltare gli errori connessi alla suddetta operazione è preferibile ripetere sia la taratura che l'analisi riducendo la quantità di campione iniettato nel fornetto di grafite oppure aumentando il flusso di gas di lavaggio in atomizzazione.
Nel caso in cui sia richiesta l'analisi di un numero notevole di campioni si consiglia di controllare la taratura inserendo ogni cinque campioni una soluzione di controllo utilizzata per la taratura e verificando che il valore di quest'ultima risulti entro il ±5% del valore atteso.

7.3.2 Metodo delle aggiunte note

Il campione viene suddiviso in quattro aliquote, di cui una rimane tal quale, mentre alle altre si aggiungono concentrazioni crescenti dell'analita dello stesso ordine di grandezza di quella attesa per il campione. Quindi procedere all'estrazione come descritto in (7.1) Misurare l'assorbanza delle quattro soluzioni e del bianco dei reattivi seguendo le indicazioni riportate al Paragrafo 7.2, avendo cura di ripetere le misure almeno tre volte. La concentrazione totale di cromo (VI) presente nelle aliquote deve comunque essere inferiore al valore limite oltre il quale la risposta strumentale non è più lineare.

8. Calcoli

8.1 Determinazione diretta

La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le concentrazioni (µg/L) delle soluzioni di riferimento in ascissa e le assorbanze corrispondenti, corrette del bianco, in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%. Calcolare quindi la concentrazione del cromo (VI) nel campione utilizzando l'equazione ottenuta dalla regressione lineare, tenendo conto dell'eventuale diluizione effettuata.

8.2 Metodo delle aggiunte

Siano C_1, C_2, C_3, rispettivamente le concentrazioni corrispondenti alla 1ª, 2ª, 3ª aggiunta e A_0, A_1, A_2, A_3, le assorbanze del campione (A_0) e del campione addizionato delle varie aggiunte, sottratte del bianco dei reattivi. Calcolare la retta di regressione che interpola i valori di assorbanza in funzione delle concentrazioni aggiunte, attribuendo al campione incognito di assorbanza A_0 una concentrazione "aggiunta" uguale a zero. La concentrazione incognita riferita al campione sarà data dal valore dell'intercetta sull'asse (x) cambiato di segno. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%.

9. Qualità del dato

Prove effettuate in triplicato da due laboratori su campioni di acque di scarico, dopo l'aggiunta di quantità note di cromo in modo da ottenere una concentrazione di cromo (VI) di 0,5 µg/L, hanno fornito un valore del coefficiente di variazione [CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100] pari al 20% ed un'accuratezza del 10%.
Non essendo stati utilizzati materiali di riferimento, l'accuratezza va intesa come grado di accordo tra il risultato della misurazione e il valore di riferimento accettato.

Nota: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".*
Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

METODO B3 - Determinazione del cromo (III). Metodo per spettrometria di assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica, previa separazione ed eliminazione del cromo (VI)

1. Principio del metodo

Il metodo consiste nella separazione ed eliminazione del cromo (VI) mediante estrazione del composto APDC–cromo (VI), e successiva determinazione del cromo (III) nella fase acquosa mediante iniezione diretta nel fornetto di grafite di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico. Dalla misura del segnale di assorbanza a 357,9 nm si ricava la concentrazione mediante confronto con una curva di taratura ottenuta con soluzioni a concentrazioni note di analita, comprese nel campo di indagine analitico.

2. Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione del cromo (III) in campioni di acque naturali (dolci e di mare) e di scarico nell'intervallo di concentrazione da 1 a 20 µg/L. Per concentrazioni superiori a 20 µg/L è possibile rientrare nell'intervallo indicato ricorrendo alla diluizione del campione.
Effettuando 10 determinazioni su uno stesso campione avente un contenuto di cromo (III) pari a 1 µg/L, alternate con una misura del bianco, si è potuto calcolare un limite di rivelabilità, espresso come tre volte lo scarto tipo, di 0,2 µg/L. Tale limite dipende dalla matrice e dalle condizioni strumentali applicate; può essere migliorato aumentando il volume di campione iniettato. Tuttavia applicando queste modalità vengono esaltati gli effetti delle specie interferenti.

3. Interferenze e cause di errore

L'utilizzo del correttore di fondo consente di minimizzare gli assorbimenti aspecifici eventualmente presenti. Nel caso in cui si debba determinare l'analita in una matrice sconosciuta o scarsamente caratterizzata è consigliabile ricorrere al metodo delle aggiunte note. Tale metodo permette di minimizzare le interferenze di tipo fisico e/o chimico eventualmente presenti.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". Si consiglia di conservare i campioni in bottiglie di polipropilene, o altro materiale caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli, precedentemente trattate con HNO_3 1 M per una notte e successivamente neutralizzate con acqua ad elevato grado di purezza. Per determinare soltanto il cromo (III) disciolto, il campione viene filtrato dopo il prelievo su membrana da 0,45 µm (acetato di cellulosa o policarbonato) e sottoposto al trattamento di estrazione per eliminare il cromo (VI). L'analisi deve essere effettuata prima possibile dal momento del prelievo, poiché la conservazione può favorire la riduzione del cromo (VI) da parte di composti riducenti (ad esempio sostanze organiche presenti nel campione). Si raccomanda comunque di non lasciare trascorrere più di 2-3 giorni dalla data di prelievo, conservando il campione in frigorifero.
È buona norma considerare sempre l'opportunità di predisporre un "bianco di campo", ottenuto semplicemente mediante lo stoccaggio di un'aliquota di acqua ultrapura in un recipiente identico a quello dei prelievi, da sottoporre successivamente a tutte le fasi analitiche previste per i campioni. Altri sistemi di controllo della qualità del campionamento consistono nell'uso di campioni replicati, nell'attivazione di precauzioni per proteggere i campioni in modo da evitare qualsiasi possibile contaminazione, nell'avvinamento regolare dei recipienti.

5. Apparecchiature

5.1 *Spettrofotometro di assorbimento atomico*, corredato di fornetto di grafite e di dispositivo per la correzione degli assorbimenti aspecifici.

5.2 *Lampada a catodo cavo* o altra sorgente luminosa capace di emettere lo spettro dell'elemento in esame.

5.3 *Autocampionatore* oppure micropipette tarate per il dosaggio di pochi µL.

5.4 *Dispositivo per la registrazione dell'assorbanza*, adatto ad evidenziare la forma del picco.

5.5 *Dispositivo che fornisce argon ultrapuro*

5.6 *Serie di imbuti separatori*, possibilmente in vetro Pyrex da 500 mL precedentemente lavati come descritto nel Capitolo 4.

6. Reattivi

Tutti i reattivi e l'acqua utilizzata per i lavaggi e la preparazione delle soluzioni di riferimento devono essere ad elevato grado di purezza.

6.1 *Acido nitrico concentrato (d = 1,40)*

6.2 Soluzione concentrata di cromo (III) (1000 mg/L)

Si consiglia di utilizzare soluzioni di riferimento ad elevato grado di purezza disponibili in commercio.

6.3 Soluzione diluita di cromo (III) (2,0 mg/L)

Trasferire 200 µL della soluzione (6.2) in pallone tarato da 100 mL, aggiungere 1 mL di HNO_3 (6.1) e portare a volume con acqua ad elevato grado di purezza. Questa soluzione è stabile per almeno un mese se conservata a 4°C in un contenitore caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli (polietilene o policarbonato) e opportunamente chiuso in modo da evitare sia l'evaporazione del solvente che eventuali contaminazioni.

6.4 Cloroformio ($CHCl_3$, d=1,48) ad elevato grado di purezza.

6.5 Soluzione di Ammonio Pirrolidinditiocarbammato (APDC) all'1%

Sciogliere 1 g di APDC in 100 mL di acqua. La soluzione, che ha un aspetto opalescente, è stabile per un tempo brevissimo e va quindi preparata nella quantità necessaria, al momento dell'uso. La soluzione, prima di essere adoperata, va estratta, almeno tre volte, con cloroformio (6.4) per eliminare impurezze metalliche presenti.

6.6 Ammoniaca concentrata (d=0,8)

6.7 Acido cloridrico concentrato (d=1,19)

6.8 Acido acetico glaciale (CH_3COOH, d=1,05) ad elevato grado di purezza.

6.9 Acetato di ammonio (CH_3COONH_4) ad elevato grado di purezza.

6.10 Soluzione tampone di acido acetico-acetato di ammonio

Sciogliere 250 g di acetato d'ammonio (6.9) in 150 mL di acqua e aggiungere 600 mL di acido acetico (6.8). La soluzione può essere trattata in imbuto separatore da 1 L con 7 mL di APDC e 40 mL di cloroformio (6.4) allo scopo di estrarre e allontanare con la fase organica le impurezze di metalli presenti nei reattivi.

7. Procedimento

7.1 Preparazione del campione

È opportuno trattare contemporaneamente almeno tre campioni (per acque marine non devono essere dissimili in termini di salinità per più del 5‰).
Trasferire 500 mL di campione in imbuto separatore da 1 L, aggiustare il pH a 4-5 con soluzioni diluite di acido cloridrico (6.7) o ammoniaca (6.6). Aggiungere, successivamente, la soluzione tampone (6.10), 5 mL di APDC all'1% (6.5) e 20 mL di cloroformio (6.4). Agitare per 2 minuti, quindi lasciare stratificare. Recuperare quindi la fase organica in un imbuto separatore da 100 mL se si vuole procedere alla determinazione del cromo (VI) secondo le modalità indicate nel metodo B2.
Effettuare una seconda estrazione con procedura del tutto simile ed effettuare, quindi, un lavaggio dell'imbuto separatore con 10 mL di cloroformio, riunendo le fasi organiche, dopo decantazione, nello stesso imbuto separatore da 100 mL.
Iniettare la fase acquosa nel fornetto di grafite di uno spettrofotometro di assorbimento atomico.

7.2 Ottimizzazione dei parametri strumentali

Per migliorare le prestazioni analitiche dell'apparecchiatura e per minimizzare eventuali interferenze, procedere all'ottimizzazione dei parametri strumentali seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento o in altri protocolli standardizzati. In Tabb. 1-2 sono elencate, a titolo di esempio, le condizioni operative tipiche per l'esecuzione delle analisi.

Tabella 1: Condizioni operative strumentali

Lunghezza d'onda (nm)	357,9
Fenditura (nm)	0,7
Rilevazione del segnale	altezza o area del picco
Correzione del fondo	attivata
Tubo	pirolitico
Intensità di corrente della lampada (mA)	come da specifica
Volume del campione (μL)	50

Tabella 2: Programma termico

	T°C	RT	HT	G	R
Essiccamento	120	20	20	300	
Incenerimento	1200	40	20	300	
Atomizzazione	2400	0	5	0	*
Pulizia	2600	1	5	300	

RT = tempo in secondi della rampa di temperatura
HT = tempo in secondi di permanenza alla temperatura impostata (isoterma)
T°C = temperatura impostata in °C
G = flusso del gas di lavaggio (argon ultrapuro) in mL/minuto
R = attivazione della lettura in atomizzazione.

Il ciclo elettrotermico riportato è valido nel caso in cui si utilizzi un tubo di grafite pirolitica; in tutti gli altri casi andrà ottimizzato, prendendo come riferimento quello generalmente consigliato dal manuale d'uso fornito a corredo dell'apparecchiatura.

7.3 Analisi

7.3.1 Determinazione diretta

Dopo aver impostato i parametri strumentali come descritto in (7.2), costruire la curva di taratura utilizzando almeno tre soluzioni di riferimento e il bianco dei reattivi, sottoposte allo stesso trattamento seguito per il campione; le soluzioni di riferimento vanno preparate diluendo opportunamente la soluzione (6.3), in modo tale da coprire l'intero campo di indagine analitico. Ripetere la misura di ogni soluzione di riferimento compreso il bianco almeno tre volte.
Quindi, eseguire l'analisi dei campioni effettuando almeno tre letture per ogni soluzione da analizzare; si considerano accettabili i valori che forniscono un coefficiente di variazione inferiore al 10%. Le analisi dei campioni, delle soluzioni di riferimento e del bianco dei reattivi devono essere effettuate nelle stesse condizioni strumentali. Se la risposta del campione incognito analizzato cade al di fuori dell'intervallo di linearità diluire opportunamente il campione per riportarlo nel campo di linearità. Qualora risulti necessaria una diluizione del campione talmente elevata da esaltare gli errori connessi alla suddetta operazione è preferibile ripetere sia la taratura che l'analisi riducendo la quantità di campione iniettato nel fornetto di grafite oppure aumentando il flusso di gas di lavaggio in atomizzazione.
Nel caso in cui sia richiesta l'analisi di un numero notevole di campioni si consiglia di controllare la taratura inserendo ogni cinque campioni una soluzione di controllo utilizzata per la taratura e verificando che il valore di quest'ultima risulti entro il ±5% del valore atteso.

7.3.2 Metodo delle aggiunte note

Il campione viene suddiviso in quattro aliquote, di cui una rimane tal quale, mentre alle altre si aggiungono concentrazioni crescenti dell'analita dello stesso ordine di grandezza di quella attesa per il campione. Quindi si procede all'estrazione come descritto in (7.1). Misurare l'assorbanza delle quattro soluzioni e del bianco dei reattivi seguendo le indicazioni riportate al Paragrafo 7.2, avendo cura di ripetere le misure almeno tre volte. La concentrazione totale di cromo (III) presente nelle aliquote deve comunque essere inferiore al valore limite oltre il quale la risposta strumentale non è più lineare.

8. Calcoli

8.1 Determinazione diretta

La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le concentrazioni (µg/L) delle soluzioni di riferimento in ascissa e le assorbanze corrispondenti, corrette del bianco, in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%. Calcolare quindi la concentrazione del cromo (III) nel campione utilizzando l'equazione ottenuta dalla regressione lineare, tenendo conto dell'eventuale diluizione effettuata.

8.2 Metodo delle aggiunte

Siano C_1, C_2, C_3, rispettivamente le concentrazioni corrispondenti alla 1ª, 2ª, 3ª aggiunta e A_0, A_1, A_2, A_3, le assorbanze del campione (A_0) e del campione addizionato delle varie aggiunte, sottratte del bianco dei reattivi. Calcolare la retta di regressione che interpola i valori di assorbanza in funzione delle concentrazioni aggiunte, attribuendo al campione incognito di assorbanza A_0 una concentrazione "aggiunta" uguale a zero. La concentrazione incognita riferita al campione sarà data dal valore dell'intercetta sull'asse (x) cambiato di segno. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%.

9. Qualità del dato

Prove effettuate in triplicato da due laboratori su campioni di acque di scarico, dopo l'aggiunta di quantità note di cromo in modo da ottenere una concentrazione di cromo di 10 µg/L, hanno fornito un valore del coefficiente di variazione, [CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100], pari al 10% ed un'accuratezza dell'8%.
Non essendo stati utilizzati materiali di riferimento, l'accuratezza va intesa come grado di accordo tra il risultato della misurazione e il valore di riferimento accettato.

Nota: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".*
Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

METODO B4 – Determinazione del cromo totale disciolto previa concentrazione dell'analita mediante coprecipitazione con idrossido ferrico ed analisi in spettrometria di assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica (ETA-ASS)

1. Principio del metodo

Il cromo totale disciolto viene determinato in assorbimento atomico con fornetto di grafite alla lunghezza d'onda di 357,9 nm dopo un procedimento di preconcentrazione che si basa sulla coprecipitazione dell'analita con idrossido ferrico, generato in ambiente alcalino dall'ossidazione di un sale ferroso, e sulla successiva ridissoluzione del cromo coprecipitato. Il metodo si applica sia alle specie trivalenti che a quelle esavalenti. Nelle condizioni del metodo il Cr (III) è coprecipitato direttamente dall'idrossido ferrico mentre il Cr (VI) è preventivamente ridotto a Cr (III) dal sale ferroso e quindi coprecipitato insieme al Cr (III).

2. Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione del cromo nel campo di concentrazione compreso tra 0,5 e 2,0 μg/L, che è il campo entro cui sono comprese le concentrazioni delle acque naturali, incluse quelle di mare. Effettuando 10 determinazioni su uno stesso campione avente un contenuto di cromo pari a 0,5 μg/L, alternate con una misura del bianco, si è potuto calcolare un limite di rivelabilità, espresso come tre volte lo scarto tipo, di 0,1 μg/L (volume di campione iniettato: 25 μL).
Concentrazioni più elevate possono essere determinate avendo l'accortezza di modificare il volume di HCl aggiunto, di cui al Paragrafo 7.1 seguente, per la ridissoluzione del precipitato.

3. Interferenze e cause di errore

L'utilizzo del correttore di fondo consente di minimizzare gli assorbimenti aspecifici eventualmente presenti. Nel caso in cui si debba determinare l'analita in una matrice sconosciuta o scarsamente caratterizzata è consigliabile ricorrere al metodo delle aggiunte note. Tale metodo permette di minimizzare le interferenze di tipo fisico e/o chimico eventualmente presenti. La procedura di coprecipitazione è particolarmente indicata per risolvere interferenze dovute a matrici saline quali acque di mare.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il prelievo e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". Dati i bassi livelli di concentrazione in cui il metodo opera, lo stesso è rivolto essenzialmente alla determinazione del cromo totale disciolto, ottenibile dopo filtrazione immediata del campione attraverso un filtro di policabonato da 0,45 μm.

5. Apparecchiature

5.1 Normale vetreria di laboratorio

Tutta la vetreria deve essere preliminarmente lavata con acido nitrico diluito (1+9) caldo e accuratamente risciacquata con acqua distillata ad elevata purezza. Disponibilità di fiale in polietilene da 10 mL.

5.2 Spettrofotometro di assorbimento atomico, corredato di fornetto di grafite e di dispositivo per la correzione degli assorbimenti aspecifici.

5.3 Lampada a catodo cavo o altra sorgente luminosa capace di emettere lo spettro dell'elemento in esame.

5.4 Autocampionatore oppure micropipette tarate per il dosaggio di pochi μL.

5.5 Dispositivo per la registrazione dell'assorbanza, adatto ad evidenziare la forma del picco.

5.6 Dispositivo che fornisce argon ultrapuro

5.7 pHmetro, corredato possibilmente di elettrodo combinato.

5.8 Apparato di filtrazione sotto vuoto o sotto pressione e filtri in policarbonato da 0,45 μm.

6. Reattivi

Sia i reattivi che l'acqua utilizzata per il risciacquo della vetreria e la preparazione delle soluzioni devono essere ad elevata purezza.

6.1 Soluzione di solfato ferroso ammonico (6 g/L)

Sciogliere 0,3 g di $Fe(NH_4)_2 \cdot (SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ in 50 mL di acqua. La soluzione va preparata poco prima dell'uso.

6.2 Idrossido di ammonio di grado ultrapuro (10%)

Diluire in modo appropriato le soluzioni concentrate disponibili in commercio che hanno un titolo di circa il 35%.

6.3 Acido cloridrico di grado ultrapuro (1+2)

Versare 33 mL di acido cloridrico concentrato in un pallone da 100 mL contenente circa 50 mL di acqua e portare a volume.

6.4 Acido nitrico concentrato di grado ultrapuro (d=1,40)

6.5 Soluzione concentrata di cromo (1000 mg/L)

Si consiglia di utilizzare soluzioni di riferimento ad elevato grado di purezza disponibili in commercio.

6.6 Soluzione diluita di cromo (100 mg/L)

Prelevare 10 mL della soluzione concentrata di cromo (6.5) e diluirla a 100 mL in pallone tarato previa aggiunta di 20 mL di HCl (6.3).

6.7 Soluzione di cromo (100 μg/L)

Prelevare 1 mL della soluzione di riferimento diluita (6.6) con una pipetta automatica e portare a volume in un matraccio tarato da 1000 mL, previa aggiunta di 50 mL di HCl (6.3). La soluzione è stabile per circa un mese. Nel caso in cui non si disponga di pipette automatiche sarà opportuno operare una doppia diluizione anziché direttamente la diluizione 1:1000 sopra riportata.

7. Procedimento

7.1 Dosaggio del campione

Aggiungere a 250 mL di campione 1,5 mL di soluzione di solfato ferroso ammonico (6.1) e circa 20 µL di soluzione di idrossido di ammonio al 10% (6.2), in modo da portare il pH a 8,0. Il volume di idrossido di ammonio riportato è solo orientativo poiché l'esatto dosaggio va definito in funzione della matrice del campione in modo che il pH finale sia 8,0. Tenere la sospensione in agitazione per 1 ora e al termine dell'agitazione recuperare il precipitato attraverso filtrazione su filtro in policarbonato da 0,45 µm. Il filtro va quindi trasferito con pinzette di plastica in una fiala in politene da 10 mL. Si aggiungono 5 mL di HCl ultrapuro (1+2) (6.3) per consentire la ridissoluzione del cromo. È opportuno sottolineare che la ridissoluzione va effettuata subito dopo il trattamento di coprecipitazione, poiché processi di invecchiamento degli idrossidi potrebbero rendere in seguito la ridissoluzione più difficoltosa.
Nel caso in cui i risultati indichino concentrazioni di analita che cadono in prossimità dell'estremo superiore del campo di applicazione del metodo, diluire opportunamente con HCl (6.3) le soluzioni provenienti dalla procedura di ridissoluzione per far sì che i valori di assorbanza rientrino nel campo di linearità strumentale.
La soluzione acida è stabile e può essere letta all'assorbimento atomico (metodo B1) anche a distanza di tempo.

7.2 Taratura

È consigliabile operare con il metodo delle aggiunte, anche se alcune prove hanno dimostrato che le assorbanze dei riferimenti interni ottenuti per aggiunta dell'analita al campione sono in ottimo accordo con quelle relative a soluzioni di riferimento esterne. Suddividere il campione in quattro aliquote da 250 mL. Una delle aliquote serve per la determinazione vera e propria, mentre le altre tre vengono addizionate di 1 mL, 2 mL e 3 mL di soluzione di riferimento diluita di cromo (6.7) in modo da avere una concentrazione aggiunta di cromo pari a 0,4 µg/L; 0,8 µg/L e 1,2 µg/L. Sottoporre quindi queste tre aliquote allo stesso trattamento del campione vero e proprio descritto in (7.1). Per ottenere il bianco dei reattivi, aggiungere in una fiala da 10 mL in polietilene 1,5 mL di solfato ferroso ammonico (6.1), un volume di soluzione di idrossido di ammonio (6.2) comparabile a quello aggiunto ai campioni e 5 mL (o un volume uguale a quello impiegato al Paragrafo 7.1) di HCl ultrapuro (6.3).
Determinare i valori di assorbanza dei riferimenti interni in assorbimento atomico seguendo le modalità indicate nel metodo B1.

8. Calcoli

8.1 Metodo delle aggiunte

Siano C_1, C_2, C_3, rispettivamente le concentrazioni corrispondenti alla 1°, 2°, 3° aggiunta e A_0, A_1, A_2, A_3, le assorbanze del campione (A_0) e del campione addizionato delle varie aggiunte, sottratte del bianco dei reattivi. Calcolare la retta di regressione che interpola i valori di assorbanza in funzione delle concentrazioni aggiunte, attribuendo al campione incognito di assorbanza A_0 una concentrazione "aggiunta" uguale a zero. La concentrazione incognita riferita al campione sarà data dal valore dall'intercetta sull'asse (x) cambiato di segno. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%.

9. Qualità del dato

Prove effettuate (n=5) da tre laboratori su campioni sintetici hanno fornito valori del coefficiente di variazione [CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100], compresi tra il 3% e l'8%.

Prove di recupero, basate sul confronto delle assorbanze ottenute per una determinata concentrazione di cromo utilizzando sia il metodo dei riferimenti interni che quello dei riferimenti esterni, hanno dato valori superiori al 90%.
Va tenuto presente che la precisione e accuratezza di un metodo generalmente peggiorano all'aumentare della complessità della matrice.
Non essendo stati utilizzati materiali di riferimento, l'accuratezza va intesa come grado di accordo tra il risultato della misurazione e il valore di riferimento accettato.

METODO C - Determinazione spettofotometrica diretta del cromo (VI) mediante difenilcarbazide

1. Principio del metodo

Il metodo si basa sullo sviluppo del colore conseguente alla reazione tra cromo (VI) e difenilcarbazide. Il meccanismo di tale reazione ancora non completamente noto sembra consistere in una riduzione del cromo (VI) a cromo (III) e in una contemporanea ossidazione della difenilcarbazide a difenilcarbazone con conseguente formazione di un composto colorato in rosso-violetto.
Il cromo (VI) viene determinato eseguendo le misure di assorbanza alla lunghezza d'onda di 540 nm. La reazione è molto sensibile e il coefficiente di estinzione molare è circa 40.000 $L \cdot mole^{-1} \cdot cm^{-1}$ a tale lunghezza d'onda.

2. Campo di applicazione

Questo metodo consente la determinazione del solo cromo (VI) direttamente nel campione di acque naturali e di scarico, nell'intervallo di concentrazione compreso tra 0,1 e 1 mg/L.
In linea di principio il metodo è applicabile a campioni di acqua di mare se i livelli di concentrazione del cromo (VI) lo consentono.
Concentrazioni più elevate possono essere determinate previa diluizione del campione.

3. Interferenze e di errore

La reazione sulla quale si basa il metodo è assai specifica tanto che alla lunghezza d'onda di 540 nm le interferenze sono praticamente trascurabili con una banda passante dello strumento sufficientemente stretta.
Interferenze positive possono essere costituite dai sali di mercurio e del molibdeno (VI) che reagiscono con la difenilcarbazide dando luogo a complessi colorati; tuttavia la debole intensità della colorazione data da questi due metalli consente di tollerare concentrazioni dell'interferente fino a 200 mg/L.
Interferenze positive sono anche prodotte dal vanadio quando la sua concentrazione supera di un fattore 10 quella del cromo (VI) e dal ferro trivalente che produce una colorazione giallina a concentrazioni >1 mg/L.
Causa di interferenza negativa può essere costituita dalla presenza di sostanze ossidanti, come NO_2 (per concentrazioni superiori a 5 mg/L) e cloro libero per concentrazioni superiori a 2 mg/L, che provocano decomposizione del complesso colorato. Altra interferenza negativa può essere prodotta dalla presenza di acqua ossigenata che in condizioni acide riduce il cromo (VI) a cromo (III).

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campione deve essere prelevato in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".

Se si desidera effettuare l'analisi del solo cromo (VI) disciolto è necessario filtrare il campione subito dopo il prelievo, attraverso filtri da 0,45 µm. Si raccomanda di eseguire l'analisi il più presto possibile dal momento del prelievo per prevenire reazioni di ossido-riduzione. Se ciò non dovesse essere possibile si raccomanda di conservare il campione, al massimo per 2-3 giorni dalla data di prelievo, in frigorifero.

5. Apparecchiature

5.1 *Spettrofotometro* per misure nel campo del visibile munito di celle con cammino ottico da 1 cm o superiori.

5.2 *Vetreria da laboratorio*

Si consiglia di lavare la vetreria con HNO_3 (1+1) ed acqua.

6. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi. L'acqua utilizzata deve essere distillata e/o deionizzata.

6.1 *Soluzione concentrata di cromo (VI) [1,00 mL=0,050 mg di Cr (VI)]*

Si consiglia di utilizzare soluzioni di riferimento ad elevato grado di purezza disponibili in commercio.
In alternativa, pesare 0,1414 g di dicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$), previamente essiccato in stufa a 110°C per almeno 2 ore. Sciogliere in acqua, trasferire la soluzione in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua.

6.2 *Soluzione diluita di cromo (VI) [1,00 mL=0,005 mg Cr (VI)]*

Prelevare 10,0 mL della soluzione concentrata (6.1), trasferirli in un matraccio tarato da 100 mL e portare a volume con acqua.

6.3 *Acido solforico concentrato H_2SO_4 (d=1,84)*

6.4 *Soluzione di acido solforico (1+1)*

Ad un volume di acqua aggiungere con cautela un ugual volume di H_2SO_4 concentrato (6.3).

6.5 *Acido nitrico concentrato HNO_3 (d=1,42)*

6.6 *Soluzione di acido nitrico diluito (1+3)*

Aggiungere a 3 volumi di acqua 1 volume di acido nitrico concentrato (6.5).

6.7 *Soluzione di difenilcarbazide*

Sciogliere 0,25 g di 1,5-difenilcarbazide in 50 mL di acetone. Conservare in bottiglia scura e rinnovare la soluzione quando si rileva decolorazione.

7. Procedimento

7.1 Taratura

Trasferire 2,00 mL; 5,00 mL; 10,0 mL; 15,0 mL e 20,0 mL della soluzione diluita di cromo (VI) (6.2) in matracci tarati da 100 mL e portare a volume con acqua. Si ottengono così soluzioni di riferimento aventi, rispettivamente, concentrazioni di cromo pari a 100 µg/L; 250 µg/L; 500 µg/L; 750 µg/L e 1000 µg/L. Preparare anche un bianco con 100 mL di acqua da trattare come le altre soluzioni.
Aggiungere 1 mL di acido solforico (1+1) (6.4) e 2 mL di soluzione di difenilcarbazide (6.7). Mescolare con cura e attendere lo sviluppo del colore per 5 minuti.
Trasferire un'aliquota di ciascuna soluzione di riferimento nella cella di misura e leggere a 540 nm l'assorbanza corrispondente usando come riferimento acqua acidificata con acido solforico (1+1) (1 mL di H_2SO_4 (6.4) in 100 mL di acqua).
Costruire la curva di taratura riportando per ciascuna delle soluzioni di riferimento i valori di assorbanza sottratti del valore del bianco in funzione delle corrispondenti concentrazioni.

7.2 *Determinazione*

Trasferire 100 mL di campione in matraccio tarato da 100 mL, aggiungere 1 mL di acido solforico (6.4) e 2 mL di soluzione di difenilcarbazide (6.7). Mescolare con cura e attendere lo sviluppo del colore per 5-10 minuti.
Trasferire un'aliquota della soluzione nella cella di misura e leggere a 540 nm l'assorbanza usando come riferimento acqua acidificata con acido solforico (1+1) (1 mL di H_2SO_4 (6.4) in 100 mL di acqua).

8. Calcoli

Dal valore di assorbanza, corretto del valore del bianco, risalire alla concentrazione di cromo (VI) nel campione utilizzando la curva di taratura.

9. Qualità del dato

Prove effettuate (n=5) da tre laboratori su soluzioni di acqua deionizzata aventi una concentrazione di cromo (VI) di 400 µg/L hanno fornito un coefficiente di variazione, [CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100], pari al 5%.
Va tenuto presente che la precisione di un metodo generalmente peggiora all'aumentare della complessità della matrice.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA), 3-24/3-31.

IRSA (1986 a): "I metalli nelle acque: origine, distribuzione, metodi di rimozione", Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **71**, 21-22.

IRSA (1986 b): "Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **75**, 263-278.

PETTINE M., LA NOCE T. & LIBERATORI A. (1988): "Hydrogen peroxide interferences in the

determination of chromium (VI) by the diphenylcarbazide method", *Anal. Chim. Acta*, **209**, 315-319.

UNICHIM (1995): "*Linee Guida per la taratura della strumentazione analitica - Spettrometri di assorbimento atomico a fiamma (FAAS)*", Manuale 177/1, Milano.

UNICHIM (1996): "*Linee Guida per la taratura della strumentazione analitica – Spettrometri di assorbimento atomico ad atomizzazione elettrotermica (EAAS)*", Manuale 177/2, Milano.

3160. Ferro

Il ferro è il quarto elemento per abbondanza nella crosta terrestre. Si trova raramente allo stato nativo, mentre i minerali più importanti del ferro sono FeS_2, Fe_3O_4, $FeCO_3$, Fe_2O_3. Il ferro è largamente impiegato in metallurgia per la produzione di ghise e acciai. Nelle acque naturali è presente solitamente nelle forme Fe^{2+}, Fe^{3+}, in complessi organometallici e in forme colloidali; la concentrazione di riferimento in acque fluviali incontaminate è di circa 50 µg/L mentre nelle acque marine il livello è pari a 0,2 µg/L. Il ferro ferroso è più solubile e si trova in acque prive di ossigeno ed a bassi potenziali redox, quali ad esempio quelle ipolimniche di laghi profondi e stratificati. Se le condizioni anossiche portano alla produzione di H_2S, si può formare il solfuro (FeS) che precipita. Al contrario, una ossigenazione delle acque porta rapidamente all'ossidazione dello ione ferroso a ione ferrico, con conseguente precipitazione dell'idrossido che mostra una spiccata tendenza a dar luogo a processi di adsorbimento e coprecipitazione. In presenza di elevate quantità di sostanza organica disciolta (ad esempio acidi umici e fulvici), il ferro può raggiungere concentrazioni più elevate. In acque aventi alta alcalinità con pH tra 7 e 10, la solubilità del ferro dipende essenzialmente da quella del $Fe(CO_3)$. La mobilità geochimica globale del ferro è bassa perchè nell'ambiente superficiale prevalgono le forme ossidate poco solubili. Ciò è chiaramente evidenziato dai tenori che si riscontrano nelle acque oceaniche in rapporto ai contenuti di ferro nella crosta terrestre (2 µg/L e 56000 ppm, rispettivamente).
Valori di circa 1 mg/L possono causare effetti dannosi per la fauna ittica.
Criteri di qualità proposti da vari enti internazionali (ente di protezione ambientale canadese, US EPA, WRC-UK) forniscono per il ferro solubile un valore di 300 µg/L per la protezione della vita acquatica e un valore di 50 µg/L per le acque ad uso potabile.
Il D.Lgs. 152/99, in materia di tutela delle acque dall'inquinamento, inserisce il ferro tra i macrodescrittori dello stato chimico dei corpi idrici sotterranei ai fini della loro classificazione, fissando un valore di <50 µg/L per la classe di migliore qualità, ≤200 µg/L per le classi intermedie e >200 µg/L per la classe peggiore. Tale decreto stabilisce altresì criteri diversificati, in funzione dei trattamenti chimico-fisici più o meno spinti previsti, per il ferro disciolto (100 e 1000 µg/L) in acque superficiali destinate alla potabilizzazione.

METODO A - Determinazione per spettrometria di assorbimento atomico con atomizzazione in fiamma (F-AAS)

1. Principio del metodo

Il ferro viene determinato per aspirazione diretta del campione nella fiamma (aria-acetilene) di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico. Dalla misura del segnale di assorbanza a 248,3 nm si ricava la concentrazione mediante confronto con una curva di taratura ottenuta con soluzioni a concentrazioni note di analita, comprese nel campo di indagine analitico.

2. Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione del ferro in campioni di acque naturali e di scarico nell'intervallo di concentrazione da 0,2 a 5,0 mg/L. Per concentrazioni superiori a 5 mg/L è possibile rientrare nell'intervallo indicato ricorrendo alla diluizione del campione oppure fa-

cendo ricorso ad una lunghezza d'onda meno sensibile, prendendo come riferimento quelle generalmente consigliate dal manuale d'uso fornito a corredo dell'apparecchiatura.
Effettuando 10 determinazioni su uno stesso campione avente un contenuto di ferro pari a 0,1 mg/L, alternate con una misura del bianco, si è potuto calcolare un limite di rivelabilità, espresso come tre volte lo scarto tipo, di 0,02 mg/L.

3. Interferenze e cause di errore

L'utilizzo del correttore di fondo consente di minimizzare gli assorbimenti aspecifici eventualmente presenti. Nel caso in cui si debba determinare l'analita in una matrice sconosciuta o scarsamente caratterizzata è consigliabile ricorrere al metodo delle aggiunte note. Tale metodo permette di minimizzare le interferenze di matrice di tipo fisico e/o chimico (variazioni di densità, viscosità, tensione superficiale) eventualmente presenti.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". Si consiglia di conservare i campioni in bottiglie di polipropilene, o altro materiale caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli, precedentemente trattate con HNO_3 1 M per una notte e successivamente neutralizzate con acqua ad elevato grado di purezza. Per determinare soltanto il ferro disciolto, il campione viene filtrato dopo il prelievo su membrana da 0,45 µm (acetato di cellulosa o policarbonato) e acidificato fino a pH<2 con HNO_3 (6.1). L'analisi deve essere effettuata prima possibile e comunque il campione acidificato rimane stabile per almeno una settimana dal prelievo. Per la determinazione quantitativa del ferro totale si rimanda alle Sezioni 3000 e 3010.

5. Apparecchiature

5.1 *Spettrofotometro di assorbimento atomico*, corredato di bruciatore standard per aria-acetilene e di dispositivo per la correzione degli assorbimenti aspecifici.

5.2 *Lampada a catodo cavo* o altra sorgente luminosa capace di emettere lo spettro dell'elemento in esame.

6. Reattivi

Tutti i reattivi e l'acqua utilizzata per i lavaggi e la preparazione delle soluzioni di riferimento devono essere ad elevato grado di purezza.

6.1 *Acido nitrico concentrato (d=1,40)*

6.2 *Soluzione concentrata di ferro (1000 mg/L)*

Si consiglia di utilizzare soluzioni di riferimento ad elevato grado di purezza disponibili in commercio.

6.3 *Soluzione diluita di ferro (10,0 mg/L)*

Trasferire 1,0 mL della soluzione (6.2) in pallone tarato da 100 mL, aggiungere 1 mL di HNO_3 (6.1) e portare a volume con acqua ad elevato grado di purezza. Questa soluzione è stabile per almeno un mese se conservata a 4°C in un contenitore caratterizzato da scarse pro-

prietà di cessione o adsorbimento di metalli (polietilene o policarbonato) e opportunamente chiuso in modo da evitare sia l'evaporazione del solvente che eventuali contaminazioni.

7. Procedimento

7.1 Ottimizzazione dei parametri strumentali

Per migliorare le prestazioni analitiche dell'apparecchiatura e per minimizzare eventuali interferenze, procedere all'ottimizzazione dei parametri strumentali seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento o in altri protocolli standardizzati. In Tab. 1 sono elencate, a titolo di esempio, le condizioni operative tipiche per l'esecuzione delle analisi.

Tabella 1: Condizioni operative strumentali

Lunghezza d'onda (nm)	248,3
Fenditura (nm)	0,2
Correzione del fondo	attivata
Fiamma	aria-acetilene
Intensità di corrente della lampada (mA)	come da specifica

7.2 Analisi

7.2.1 Determinazione diretta

Dopo aver impostato i parametri strumentali come descritto in (7.1), costruire la curva di taratura utilizzando almeno tre soluzioni di riferimento preparate diluendo opportunamente la soluzione (6.3), in modo tale da coprire l'intero campo di indagine analitico, e il bianco dei reattivi. Ripetere la misura di ogni soluzione di riferimento compreso il bianco almeno tre volte.
Quindi, eseguire l'analisi dei campioni effettuando almeno tre letture per ogni soluzione da analizzare; si considerano accettabili i valori che forniscono un coefficiente di variazione inferiore al 5%. Le analisi dei campioni, delle soluzioni di riferimento e del bianco dei reattivi devono essere effettuate nelle stesse condizioni strumentali. Se la risposta del campione incognito analizzato cade al di fuori dell'intervallo di linearità diluire opportunamente il campione per riportarlo nel campo di linearità. Qualora risulti necessaria una diluizione del campione talmente elevata da esaltare gli errori connessi alla suddetta operazione è preferibile ripetere sia la taratura che l'analisi ricorrendo ad un'altra riga analitica meno sensibile.
Nel caso in cui sia richiesta l'analisi di un numero notevole di campioni si consiglia di controllare la taratura inserendo ogni cinque campioni una soluzione di controllo utilizzata per la taratura e verificando che il valore di quest'ultima risulti entro il ±5% del valore atteso.

7.2.2 Metodo delle aggiunte note

Il campione viene suddiviso in quattro aliquote, di cui una rimane tal quale, mentre alle altre si aggiungono concentrazioni crescenti dell'analita dello stesso ordine di grandezza di quella attesa per il campione. Misurare l'assorbanza delle quattro soluzioni e del bianco dei reattivi seguendo le indicazioni riportate al Paragrafo 7.1, avendo cura di ripetere le misure almeno tre volte. La concentrazione totale di ferro presente nelle aliquote deve comunque essere inferiore al valore limite oltre il quale la risposta strumentale non è più lineare.

8. Calcoli

8.1 Determinazione diretta

La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le concentrazioni (mg/L) delle soluzioni di riferimento in ascissa e le assorbanze corrispondenti, corrette del bianco, in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%. Calcolare quindi la concentrazione del ferro nel campione utilizzando l'equazione ottenuta dalla regressione lineare, tenendo conto dell'eventuale diluizione effettuata.

8.2 Metodo delle aggiunte

Siano C_1, C_2, C_3, rispettivamente le concentrazioni corrispondenti alla 1ª, 2ª, 3ª aggiunta e A_0, A_1, A_2, A_3, le assorbanze del campione (A_0) e del campione addizionato delle varie aggiunte, sottratte del bianco dei reattivi. Calcolare la retta di regressione che interpola i valori di assorbanza in funzione delle concentrazioni aggiunte, attribuendo al campione incognito di assorbanza A_0 una concentrazione "aggiunta" uguale a zero. La concentrazione incognita riferita al campione sarà data dal valore dell'intercetta sull'asse (x) cambiato di segno. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%.

9. Qualità del dato

Prove effettuate in quintuplicato da tre laboratori su campioni di acqua di scarico ai quali sono state aggiunte quantità di ferro in modo da avere una concentrazione di 2 mg/L hanno fornito valori del coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100, compresi tra 0,9% e 7,8% ed un'accuratezza dell'1%.
Non essendo stati utilizzati materiali di riferimento, l'accuratezza va intesa come grado di accordo tra il risultato della misurazione e il valore di riferimento accettato.
Per acque di scarico, dopo aggiunta di quantità note di ferro tali da realizzare una concentrazione finale di 4,4 mg/L, lo Standard Methods riporta una riproducibilità del 5,8% ed un'accuratezza del 2,3%.

Nota: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".*
Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

METODO B - Determinazione per spettrometria di assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica (ETA-AAS)

1. Principio del metodo

Il ferro viene determinato per iniezione diretta del campione nel fornetto di grafite di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico. Dalla misura del segnale di assorbanza a 248,3 nm si ricava la concentrazione mediante confronto con una curva di taratura ottenuta con soluzioni a concentrazioni note di analita, comprese nel campo di indagine analitico.

2. Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione del ferro in campioni di acque naturali e di scarico nell'intervallo di concentrazione da 1,0 a 40,0 µg/L. Per concentrazioni superiori a 40 µg/L è possibile rientrare nell'intervallo indicato ricorrendo alla diluizione del campione.
Effettuando 10 determinazioni su uno stesso campione avente un contenuto di ferro pari a 1,0 µg/L, alternate con una misura del bianco, si è potuto calcolare un limite di rivelabilità, espresso come tre volte lo scarto tipo, di 0,2 µg/L (volume iniettato: 25 µL di campione e 25 µL di modificante). Tale limite dipende dalla matrice e dalle condizioni strumentali applicate; può essere leggermente migliorato aumentando il volume di campione iniettato. Tuttavia applicando queste modalità vengono esaltati gli effetti delle specie interferenti.

3. Interferenze e cause di errore

L'utilizzo del correttore di fondo consente di minimizzare gli assorbimenti aspecifici eventualmente presenti. Nel caso in cui si debba determinare l'analita in una matrice sconosciuta o scarsamente caratterizzata è consigliabile ricorrere al metodo delle aggiunte note. Tale metodo permette di minimizzare le interferenze di tipo fisico e/o chimico eventualmente presenti. Il ricorso ad un idoneo modificatore consente di rendere la matrice più volatile o di formare composti più stabili con l'elemento in esame; mediante un opportuno ciclo elettrotermico è possibile allontanare la matrice senza perdere l'analita di interesse.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". In particolare, considerando le basse concentrazioni da determinare, si consiglia di conservare i campioni in bottiglie di polipropilene o altro materiale caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli, precedentemente trattate con HNO_3 1 M per una notte e successivamente neutralizzate con acqua ad elevato grado di purezza. Per determinare soltanto il ferro disciolto, il campione viene filtrato dopo il prelievo su membrana da 0,45 µm (acetato di cellulosa o policarbonato) e acidificato fino a pH<2 con HNO_3 (6.1). L'analisi deve essere effettuata prima possibile e comunque il campione acidificato rimane stabile per almeno una settimana dal prelievo. Per la determinazione quantitativa del ferro totale si rimanda alle Sezioni 3000 e 3010.
È buona norma considerare sempre l'opportunità di predisporre un "bianco di campo", ottenuto semplicemente mediante lo stoccaggio di un'aliquota di acqua ultrapura in un recipiente identico a quello dei prelievi, da sottoporre successivamente a tutte le fasi analitiche previste per i campioni. Altri sistemi di controllo della qualità del campionamento consistono nell'uso di campioni replicati, nell'attivazione di precauzioni per proteggere i campioni in modo da evitare qualsiasi possibile contaminazione, nell'avvinamento regolare dei recipienti.

5. Apparecchiature

5.1 *Spettrofotometro di assorbimento atomico*, corredato di fornetto di grafite e di dispositivo per la correzione degli assorbimenti aspecifici.

5.2 *Lampada a catodo cavo* o altra sorgente luminosa capace di emettere lo spettro dell'elemento in esame.

5.3 *Autocampionatore* oppure micropipette tarate per il dosaggio di pochi µL.

5.4 Dispositivo per la registrazione dell'assorbanza, adatto ad evidenziare la forma del picco.

5.5 Dispositivo che fornisce argon ultrapuro

6. Reattivi

Tutti i reattivi e l'acqua utilizzata per i lavaggi e la preparazione delle soluzioni di riferimento devono essere ad elevato grado di purezza.

6.1 Acido nitrico concentrato (d=1,40)

6.2 Soluzione concentrata di ferro (1000 mg/L)

Si consiglia di utilizzare soluzioni di riferimento ad elevato grado di purezza disponibili in commercio.

6.3 Soluzione diluita di ferro di ferro (2,0 mg/L)

Trasferire 200 µL della soluzione (6.2) in pallone tarato da 100 mL, aggiungere 1 mL di HNO_3 (6.1) e portare a volume con acqua ad elevato grado di purezza. Questa soluzione è stabile per almeno un mese se conservata a 4°C in un contenitore caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli (polietilene o policarbonato) e opportunamente chiuso in modo da evitare sia l'evaporazione del solvente che eventuali contaminazioni.

6.4 Modificatore di matrice $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$

Sciogliere 0,3455 g di $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ di grado ultrapuro in acqua deionizzata e portare a volume in matraccio tarato da 100 mL in polietilene. È possibile utilizzare anche altri modificatori seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento.

7. Procedimento

7.1 Ottimizzazione dei parametri strumentali

Per migliorare le prestazioni analitiche dell'apparecchiatura e per minimizzare eventuali interferenze, procedere all'ottimizzazione dei parametri strumentali seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento o in altri protocolli standardizzati. In Tabb. 1 -2 sono elencate, a titolo di esempio, le condizioni operative tipiche per l'esecuzione delle analisi.

Tabella 1: Condizioni operative strumentali

Lunghezza d'onda (nm)	248,3
Fenditura (nm)	0,2
Rilevazione del segnale	altezza o area del picco
Correzione del fondo	attivata
Tubo	pirolitico
Intensità di corrente della lampada (mA)	come da specifica
Volume del campione (µL)	25
Volume del modificante di matrice (µL)	25

Il ciclo elettrotermico riportato è valido nel caso in cui si utilizzi un tubo di grafite pirolitica; in tutti gli altri casi andrà ottimizzato, prendendo come riferimento quello generalmente consigliato dal manuale d'uso fornito a corredo dell'apparecchiatura.

Tabella 2: Programma termico

	T°C	RT	HT	G	R
Essiccamento	120	20	20	300	
Incenerimento	1400	40	20	300	
Atomizzazione	2400	0	5	0	*
Pulizia	2600	1	5	300	

RT = tempo in secondi della rampa di temperatura
HT = tempo in secondi di permanenza alla temperatura impostata (isoterma)
T°C = temperatura impostata in °C
G = flusso del gas di lavaggio (argon ultrapuro) in mL/minuto
R = attivazione della lettura in atomizzazione.

7.2 Analisi

7.2.1 Determinazione diretta

Dopo aver impostato i parametri strumentali come descritto in (7.1), costruire la curva di taratura utilizzando almeno tre soluzioni di riferimento scelte nel campo di indagine analitico, preparate diluendo opportunamente la soluzione (6.3), e il bianco dei reattivi. Ripetere la misura di ogni soluzione di riferimento compreso il bianco almeno tre volte.
Quindi, eseguire l'analisi dei campioni effettuando almeno tre letture per ogni soluzione da analizzare; si considerano accettabili i valori che forniscono un coefficiente di variazione inferiore al 10%. Le analisi dei campioni, delle soluzioni di riferimento e del bianco dei reattivi devono essere effettuate nelle stesse condizioni strumentali. Se la risposta del campione incognito analizzato cade al di fuori dell'intervallo di linearità, diluire opportunamente il campione per riportarlo nel campo di linearità. Qualora risulti necessaria una diluizione del campione talmente elevata da esaltare gli errori connessi alla suddetta operazione è preferibile ripetere sia la taratura che l'analisi riducendo la quantità di campione iniettato nel fornetto di grafite oppure aumentando il flusso di gas di lavaggio in atomizzazione.
Nel caso in cui sia richiesta l'analisi di un numero notevole di campioni si consiglia di controllare la taratura inserendo ogni cinque campioni una soluzione di controllo utilizzata per la taratura e verificando che il valore di quest'ultima risulti entro il ±5% del valore atteso.

7.2.2 Metodo delle aggiunte note

Il campione viene suddiviso in quattro aliquote, di cui una rimane tal quale, mentre alle altre si aggiungono concentrazioni crescenti dell'analita dello stesso ordine di grandezza di quella attesa per il campione. Misurare l'assorbanza delle quattro soluzioni e del bianco dei reattivi seguendo le indicazioni riportate al Paragrafo 7.1, avendo cura di ripetere le misure almeno tre volte. La concentrazione totale di ferro presente nelle aliquote non deve superare il valore limite oltre il quale la risposta strumentale non è più lineare.

8. Calcoli

8.1 Determinazione diretta

La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le concentrazioni (μg/L) delle soluzioni di riferimento in ascissa e le assorbanze corrispondenti, corrette del bianco, in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%. Calcolare quindi la concentrazione del ferro nel campione utilizzando l'equazione ottenuta dalla regressione lineare, tenendo conto dell'eventuale diluizione effettuata.

8.2 Metodo delle aggiunte

Siano C_1, C_2, C_3, rispettivamente le concentrazioni corrispondenti alla 1ª, 2ª, 3ª aggiunta e A_0, A_1, A_2, A_3, le assorbanze del campione (A_0) e del campione addizionato delle varie aggiunte, sottratte del bianco dei reattivi. Calcolare la retta di regressione che interpola i valori di assorbanza in funzione delle concentrazioni aggiunte, attribuendo al campione incognito di assorbanza A_0 una concentrazione "aggiunta" uguale a zero. La concentrazione incognita riferita al campione sarà data dal valore dell'intercetta sull'asse (x) cambiato di segno. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%.

9. Qualità del dato

Prove effettuate in quintuplicato da quattro laboratori su soluzioni sintetiche in acqua deionizzata hanno fornito i seguenti risultati:

Concentrazione attesa (µg/L)	5,0	20,0
Concentrazione trovata (µg/L)*	5,7 ± 1,3	19,5 ± 1,6
CV (%) intralaboratorio	11,9	3,9
CV (%) interlaboratorio	22,8	8,2
Accuratezza (%)**	14,0	2,6

** valor medio ± scarto tipo*

CV (%) = coefficiente di variazione; CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100

*** Non essendo stati utilizzati materiali di riferimento, l'accuratezza va intesa come grado di accordo tra il risultato della misurazione e il valore di riferimento accettato.*

Va tenuto presente che la precisione e accuratezza di un metodo generalmente peggiorano all'aumentare della complessità della matrice. L'EPA in uno studio condotto tra dieci laboratori riporta per campioni di acque di scarico, ad una concentrazione di 6,2 µg/L, una precisione del singolo analista pari al 29%, una precisione totale del 39% ed un'accuratezza del 112%.

Nota: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".*
Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA), 3-12/3-31.

IRSA (1986 a): "I metalli nelle acque: origine, distribuzione, metodi di rimozione", Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **71**, 21-22.

IRSA (1986 b): "Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **75**, 263-278.

UNICHIM (1995): "*Linee Guida per la taratura della strumentazione analitica - Spettrometri di assorbimento atomico a fiamma (FAAS)*", Manuale 177/1, Milano.

UNICHIM (1996): "*Linee Guida per la taratura della strumentazione analitica – Spettrometri di assorbimento atomico ad atomizzazione elettrotermica (EAAS)*", Manuale 177/2, Milano.

3170. Litio

METODO A - Determinazione per spettrometria di assorbimento atomico con atomizzazione in fiamma (F-AAS)

1. Principio del metodo

Il litio viene determinato per aspirazione diretta del campione nella fiamma (aria-acetilene) di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico. Dalla misura del segnale di assorbanza a 670,8 nm si ricava la concentrazione mediante confronto con una curva di taratura ottenuta con soluzioni a concentrazioni note di analita, comprese nel campo di indagine analitico.

2. Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione del litio in campioni di acque naturali e di scarico nell'intervallo di concentrazione da 0,05 a 2,0 mg/L. Per concentrazioni superiori a 2 mg/L è possibile rientrare nell'intervallo indicato ricorrendo alla diluizione del campione oppure facendo ricorso ad una lunghezza d'onda meno sensibile, prendendo come riferimento quelle generalmente consigliate dal manuale d'uso fornito a corredo dell'apparecchiatura.
Effettuando 10 determinazioni su uno stesso campione avente un contenuto di litio pari a 0,05 mg/L, alternate con una misura del bianco, si è potuto calcolare un limite di rivelabilità, espresso come tre volte lo scarto tipo, di 0,002 mg/L.

3. Interferenze e cause di errore

L'utilizzo del correttore di fondo consente di minimizzare gli assorbimenti aspecifici eventualmente presenti. Nel caso in cui si debba determinare l'analita in una matrice sconosciuta o scarsamente caratterizzata è consigliabile ricorrere al metodo delle aggiunte note. Tale metodo permette di minimizzare le interferenze di matrice di tipo fisico e/o chimico (variazioni di densità, viscosità, tensione superficiale) eventualmente presenti.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". Si consiglia di conservare i campioni in bottiglie di polipropilene, o altro materiale caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli, precedentemente trattate con HNO_3 1 M per una notte e successivamente neutralizzate con acqua ad elevato grado di purezza. Per determinare soltanto il litio disciolto, il campione viene filtrato dopo il prelievo su membrana da 0,45 μm (acetato di cellulosa o policarbonato) e acidificato fino a pH<2 con HNO_3 (6.1). L'analisi deve essere effettuata prima possibile e comunque il campione acidificato rimane stabile per almeno una settimana dal prelievo. Per la determinazione quantitativa del litio totale si rimanda alle Sezioni 3000 e 3010.

5. Apparecchiature

5.1 Spettrofotometro di assorbimento atomico, corredato di bruciatore standard per aria-acetilene e di dispositivo per la correzione degli assorbimenti aspecifici.

5.2 Lampada a catodo cavo o altra sorgente luminosa capace di emettere lo spettro dell'elemento in esame.

6. Reattivi

Tutti i reattivi e l'acqua utilizzata per i lavaggi e la preparazione delle soluzioni di riferimento devono essere ad elevato grado di purezza.

6.1 Acido nitrico concentrato (d=1,40)

6.2 Soluzione concentrata di litio (1000 mg/L)

Si consiglia di utilizzare soluzioni di riferimento ad elevato grado di purezza disponibili in commercio.

6.3 Soluzione diluita di litio (10,0 mg/L)

Trasferire 1,0 mL della soluzione (6.2) in pallone tarato da 100 mL, aggiungere 1 mL di HNO_3 (6.1) e portare a volume con acqua ad elevato grado di purezza. Questa soluzione è stabile per almeno un mese se conservata a 4°C in un contenitore caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli (polietilene o policarbonato) e opportunamente chiuso in modo da evitare sia l'evaporazione del solvente che eventuali contaminazioni.

7. Procedimento

7.1 Ottimizzazione dei parametri strumentali

Per migliorare le prestazioni analitiche dell'apparecchiatura e per minimizzare eventuali interferenze, procedere all'ottimizzazione dei parametri strumentali seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento o in altri protocolli standardizzati. In Tab. 1 sono elencate, a titolo di esempio, le condizioni operative tipiche per l'esecuzione delle analisi.

Tabella 1: Condizioni operative strumentali

Lunghezza d'onda (nm)	670,8
Fenditura (nm)	0,7
Correzione del fondo	attivata se possibile
Fiamma	aria-acetilene
Intensità di corrente della lampada (mA)	come da specifica

7.2 Analisi

7.2.1 Determinazione diretta

Dopo aver impostato i parametri strumentali come descritto in (7.1), costruire la curva di taratura utilizzando almeno tre soluzioni di riferimento preparate diluendo opportunamente la soluzione (6.3), in modo tale da coprire l'intero campo di indagine analitico, e il bianco dei reattivi. Ripetere la misura di ogni soluzione di riferimento compreso il bianco almeno tre volte.

Quindi, eseguire l'analisi dei campioni effettuando almeno tre letture per ogni soluzione da analizzare; si considerano accettabili i valori che forniscono un coefficiente di variazione inferiore al 5%. Le analisi dei campioni, delle soluzioni di riferimento e del bianco dei reattivi devono essere effettuate nelle stesse condizioni strumentali. Se la risposta del campione incognito analizzato cade al di fuori dell'intervallo di linearità diluire opportunamente il campione per riportarlo nel campo di linearità. Qualora risulti necessaria una diluizione del campione talmente elevata da esaltare gli errori connessi alla suddetta operazione è preferibile ripetere sia la taratura che l'analisi ricorrendo ad un'altra riga analitica meno sensibile.
Nel caso in cui sia richiesta l'analisi di un numero notevole di campioni si consiglia di controllare la taratura inserendo ogni cinque campioni una soluzione di controllo utilizzata per la taratura e verificando che il valore di quest'ultima risulti entro il ±5% del valore atteso.

7.2.2 Metodo delle aggiunte note

Il campione viene suddiviso in quattro aliquote, di cui una rimane tal quale, mentre alle altre si aggiungono concentrazioni crescenti dell'analita dello stesso ordine di grandezza di quella attesa per il campione. Misurare l'assorbanza delle quattro soluzioni e del bianco dei reattivi seguendo le indicazioni riportate al Paragrafo 7.1, avendo cura di ripetere le misure almeno tre volte. La concentrazione totale di litio presente nelle aliquote deve comunque essere inferiore al valore limite oltre il quale la risposta strumentale non è più lineare.

8. Calcoli

8.1 Determinazione diretta

La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le concentrazioni (mg/L) delle soluzioni di riferimento in ascissa e le assorbanze corrispondenti, corrette del bianco, in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%. Calcolare quindi la concentrazione del litio nel campione utilizzando l'equazione ottenuta dalla regressione lineare, tenendo conto dell'eventuale diluizione effettuata.

8.2 Metodo delle aggiunte

Siano C_1, C_2, C_3, rispettivamente le concentrazioni corrispondenti alla 1ª, 2ª, 3ª aggiunta e A_0, A_1, A_2, A_3, le assorbanze del campione (A_0) e del campione addizionato delle varie aggiunte, sottratte del bianco dei reattivi. Calcolare la retta di regressione che interpola i valori di assorbanza in funzione delle concentrazioni aggiunte, attribuendo al campione incognito di assorbanza A_0 una concentrazione "aggiunta" uguale a zero. La concentrazione incognita riferita al campione sarà data dal valore dell'intercetta sull'asse (x) cambiato di segno. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%.

9. Qualità del dato

Prove effettuate (n=5) da tre laboratori su campioni di acqua deionizzata contenenti 0,21 mg/L di litio hanno fornito un valore del coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100, pari al 19% ed un'accuratezza del 10%.
Non essendo stati utilizzati materiali di riferimento, l'accuratezza va intesa come grado di accordo tra il risultato della misurazione e il valore di riferimento accettato.

Nota: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su*

materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".
Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA), 3-12/3-24.

UNICHIM (1995): "*Linee Guida per la taratura della strumentazione analitica - Spettrometri di assorbimento atomico a fiamma (FAAS)*", Manuale 177/1, Milano.

3180. Magnesio

METODO A - Determinazione per spettrometria di assorbimento atomico con atomizzazione in fiamma (F-AAS)

1. Principio del metodo

Il magnesio viene determinato per aspirazione diretta del campione nella fiamma (aria-acetilene) di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico. Dalla misura del segnale di assorbanza a 285,2 nm si ricava la concentrazione mediante confronto con una curva di taratura ottenuta con soluzioni a concentrazioni note di analita, comprese nel campo di indagine analitico.

2. Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione del magnesio in campioni di acque naturali e di scarico nell'intervallo di concentrazione da 0,010 a 2,0 mg/L. Per concentrazioni superiori a 2 mg/L è possibile rientrare nell'intervallo indicato ricorrendo alla diluizione del campione oppure facendo ricorso ad una lunghezza d'onda meno sensibile, prendendo come riferimento quelle generalmente consigliate dal manuale d'uso fornito a corredo dell'apparecchiatura.
Effettuando 10 determinazioni su uno stesso campione avente un contenuto di magnesio pari a 0,010 mg/L, alternate con una misura del bianco, si è potuto calcolare un limite di rivelabilità, espresso come tre volte lo scarta tipo, di 0,001 mg/L.

3. Interferenze e cause di errore

L'utilizzo del correttore di fondo consente di minimizzare gli assorbimenti aspecifici eventualmente presenti. Nel caso in cui si debba determinare l'analita in una matrice sconosciuta o scarsamente caratterizzata è consigliabile ricorrere al metodo delle aggiunte note. Tale metodo permette di minimizzare le interferenze di matrice di tipo fisico e/o chimico (variazioni di densità, viscosità, tensione superficiale) eventualmente presenti.
L'aggiunta di sali di lantanio allo 0,1% consente di eliminare le interferenze da ionizzazione.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". Si consiglia di conservare i campioni in bottiglie di polipropilene, o altro materiale caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli, precedentemente trattate con HNO_3 1 M per una notte e successivamente neutralizzate con acqua ad elevato grado di purezza. Per determinare soltanto il magnesio disciolto, il campione viene filtrato dopo il prelievo su membrana da 0,45 µm (acetato di cellulosa o policarbonato) e acidificato fino a pH<2 con HNO_3 (6.1). L'analisi deve essere effettuata prima possibile e comunque il campione acidificato rimane stabile per almeno una settimana dal prelievo. Per la determinazione quantitativa del magnesio totale si rimanda alle Sezioni 3000 e 3010.

5. Apparecchiature

5.1 Spettrofotometro di assorbimento atomico, corredato di bruciatore standard per aria-acetilene e di dispositivo per la correzione degli assorbimenti aspecifici.

5.2 Lampada a catodo cavo o altra sorgente luminosa capace di emettere lo spettro dell'elemento in esame.

6. Reattivi

Tutti i reattivi e l'acqua utilizzata per i lavaggi e la preparazione delle soluzioni di riferimento devono essere ad elevato grado di purezza.

6.1 Acido nitrico concentrato (d=1,40)

6.2 Soluzione di lantanio (1% La)

6.3 Soluzione concentrata di magnesio (1000 mg/L)

Si consiglia di utilizzare soluzioni di riferimento ad elevato grado di purezza disponibili in commercio.

6.4 Soluzione diluita di magnesio (10,0 mg/L)

Trasferire 1,0 mL della soluzione (6.3) in pallone tarato da 100 mL, aggiungere 1 mL di HNO_3 (6.1) e portare a volume con acqua ad elevato grado di purezza. Questa soluzione è stabile per almeno un mese se conservata a 4°C in un contenitore caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli (polietilene o policarbonato) e opportunamente chiuso in modo da evitare sia l'evaporazione del solvente che eventuali contaminazioni.

7. Procedimento

7.1 Ottimizzazione dei parametri strumentali

Per migliorare le prestazioni analitiche dell'apparecchiatura e per minimizzare eventuali interferenze, procedere all'ottimizzazione dei parametri strumentali seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento o in altri protocolli standardizzati. In Tab. 1 sono elencate, a titolo di esempio, le condizioni operative tipiche per l'esecuzione delle analisi.

Tabella 1: Condizioni operative strumentali

Lunghezza d'onda (nm)	285,2
Fenditura (nm)	0,7
Correzione del fondo	attivata
Fiamma	aria-acetilene
Intensità di corrente della lampada (mA)	come da specifica

7.2 Analisi

7.2.1 Determinazione diretta

Dopo aver impostato i parametri strumentali come descritto in (7.1), costruire la curva di taratura utilizzando almeno tre soluzioni di riferimento preparate diluendo opportunamente la soluzione (6.4), in modo tale da coprire l'intero campo di indagine analitico, e il bianco dei reat-

tivi. Ripetere la misura di ogni soluzione di riferimento compreso il bianco almeno tre volte. Quindi, eseguire l'analisi dei campioni effettuando almeno tre letture per ogni soluzione da analizzare; si considerano accettabili i valori che forniscono un coefficiente di variazione inferiore al 5%. Le analisi dei campioni, delle soluzioni di riferimento e del bianco dei reattivi devono essere effettuate nelle stesse condizioni strumentali. Se la risposta del campione incognito analizzato cade al di fuori dell'intervallo di linearità diluire opportunamente il campione per riportarlo nel campo di linearità. Qualora risulti necessaria una diluizione del campione talmente elevata da esaltare gli errori connessi alla suddetta operazione è preferibile ripetere sia la taratura che l'analisi ricorrendo ad un'altra riga analitica meno sensibile.
Nel caso in cui sia richiesta l'analisi di un numero notevole di campioni si consiglia di controllare la taratura inserendo ogni cinque campioni una soluzione di controllo utilizzata per la taratura e verificando che il valore di quest'ultima risulti entro il ±5% del valore atteso.

7.2.2 Metodo delle aggiunte note

Il campione viene suddiviso in quattro aliquote, di cui una rimane tal quale, mentre alle altre si aggiungono concentrazioni crescenti dell'analita dello stesso ordine di grandezza di quella attesa per il campione. Misurare l'assorbanza delle quattro soluzioni e del bianco dei reattivi seguendo le indicazioni riportate al Paragrafo 7.1, avendo cura di ripetere le misure almeno tre volte. La concentrazione totale di magnesio presente nelle aliquote deve comunque essere inferiore al valore limite oltre il quale la risposta strumentale non è più lineare.

8. Calcoli

8.1 Determinazione diretta

La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le concentrazioni (mg/L) delle soluzioni di riferimento in ascissa e le assorbanze corrispondenti, corrette del bianco, in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%. Calcolare quindi la concentrazione del magnesio nel campione utilizzando l'equazione ottenuta dalla regressione lineare, tenendo conto dell'eventuale diluizione effettuata.

8.2 - Metodo delle aggiunte

Siano C_1, C_2, C_3, rispettivamente le concentrazioni corrispondenti alla 1ª, 2ª, 3ª aggiunta e A_0, A_1, A_2, A_3, le assorbanze del campione (A_0) e del campione addizionato delle varie aggiunte, sottratte del bianco dei reattivi. Calcolare la retta di regressione che interpola i valori di assorbanza in funzione delle concentrazioni aggiunte, attribuendo al campione incognito di assorbanza A_0 una concentrazione "aggiunta" uguale a zero. La concentrazione incognita riferita al campione sarà data dal valore dell'intercetta sull'asse (x) cambiato di segno. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%.

9. Qualità del dato

Prove effettuate (n=5) da tre laboratori su campioni di acqua deionizzata contenenti 0,46 mg/L di magnesio hanno fornito un valore del coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100, pari al 4,2% ed un'accuratezza del 5%.
Non essendo stati utilizzati materiali di riferimento, l'accuratezza va intesa come grado di accordo tra il risultato della misurazione e il valore di riferimento accettato.
Per acque di scarico, dopo aggiunta di quantità note di magnesio tali da realizzare una concentrazione finale di 1,1 mg/L, lo Standard Methods riporta una riproducibilità del 10,5% ed un'accuratezza del 10%.

Nota: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".*
Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA), 3-12/3-24.

UNICHIM (1995): "*Linee Guida per la taratura della strumentazione analitica - Spettrometri di assorbimento atomico a fiamma (FAAS)*", Manuale 177/1, Milano.

3190. Manganese

Il manganese rappresenta il decimo elemento, in ordine di abbondanza nella crosta terrestre. I minerali più comuni sono MnO_2, $MnCO_3$, $MnSiO_3$. Viene usato in siderurgia e nella produzione di leghe con Al, Mg, Fe, Co e Cu e nell'industria chimica (ossidante nell'industria pirotecnica, fiammiferi, vernici, fungicidi, catalizzatori). Il manganese può essere presente in natura in diversi stati di ossidazione. Nelle acque dolci incontaminate la concentrazione presa a riferimento per il manganese è di 8 µg/L mentre in acque marine è di circa 0,2 µg/L. Allo stato ridotto Mn^{2+} si comporta come elemento solubile in acqua, mentre nelle forme ossidate forma degli ossidi ed idrossidi estremamente insolubili ($Mn(OH)_2$, MnO_3, MnO_2 e Mn_3O_4). Acque naturali con caratteristiche riducenti, una volta entrate a contatto con l'atmosfera, vengono ossidate con conseguente precipitazione degli idrossidi di Mn. Acque di scarichi urbani ed industriali possono contenere concentrazioni apprezzabili di Mn(II) ed anche in questo caso la loro immissione in acque superficiali conduce, in un tempo e/o percorso più o meno lungo, all'ossidazione del Mn con conseguente precipitazione dell'idrossido insolubile. La mobilità geochimica globale del manganese è bassa perchè nell'ambiente superficiale prevalgono le forme ossidate poco solubili. Ciò è chiaramente evidenziato dai tenori che si riscontrano nelle acque oceaniche in rapporto ai contenuti di manganese nella crosta terrestre (0,2 µg/L e 950 ppm, rispettivamente).
Il manganese solitamente non costituisce un problema per la vita acquatica, poichè i valori di tolleranza per i diversi organismi variano da 1,5 a 1000 mg/L.
Il D.Lgs. 152/99, in materia di tutela delle acque dall'inquinamento, inserisce il manganese tra i macrodescrittori dello stato chimico dei corpi idrici sotterranei ai fini della loro classificazione, fissando un valore di ≤20 µg/L per la classe di migliore qualità, ≤50 µg/L per le classi intermedie e >50 µg/L per la classe peggiore. Tale decreto stabilisce altresì criteri diversificati (50, 100 e 1000 µg/L) per le acque superficiali destinate alla potabilizzazione in funzione dei trattamenti chimico-fisici più o meno spinti previsti.

METODO A - Determinazione per spettrometria di assorbimento atomico con atomizzazione in fiamma (F-AAS)

1. Principio del metodo

Il manganese viene determinato per aspirazione diretta del campione nella fiamma (aria-acetilene) di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico. Dalla misura del segnale di assorbanza a 279,5 nm si ricava la concentrazione mediante confronto con una curva di taratura ottenuta con soluzioni a concentrazioni note di analita, comprese nel campo di indagine analitico.

2. Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione del manganese in campioni di acque naturali e di scarico nell'intervallo di concentrazione da 0,1 a 2,0 mg/L. Per concentrazioni superiori a 2 mg/L è possibile rientrare nell'intervallo indicato ricorrendo alla diluizione del campione oppure facendo ricorso ad una lunghezza d'onda meno sensibile, prendendo come riferimento quelle generalmente consigliate dal manuale d'uso fornito a corredo dell'apparecchiatura.

Effettuando 10 determinazioni su uno stesso campione avente un contenuto di manganese pari a 0,1 mg/L, alternate con una misura del bianco, si è potuto calcolare un limite di rivelabilità, espresso come tre volte lo scarto tipo, di 0,01 mg/L.

3. Interferenze e cause di errore

L'utilizzo del correttore di fondo consente di minimizzare gli assorbimenti aspecifici eventualmente presenti. Nel caso in cui si debba determinare l'analita in una matrice sconosciuta o scarsamente caratterizzata è consigliabile ricorrere al metodo delle aggiunte note. Tale metodo permette di minimizzare le interferenze di matrice di tipo fisico e/o chimico (variazioni di densità, viscosità, tensione superficiale) eventualmente presenti. Una concentrazione di silice (>100 mg/L) può interferire nella determinazione del manganese. Tale interferenza può essere eliminata aggiungendo $CaCl_2$ allo 0,2% al campione, alle soluzioni di riferimento e al bianco dei reattivi.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". Si consiglia di conservare i campioni in bottiglie di polipropilene, o altro materiale caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli, precedentemente trattate con HNO_3 1 M per una notte e successivamente neutralizzate con acqua ad elevato grado di purezza. Per determinare soltanto il manganese disciolto, il campione viene filtrato dopo il prelievo su membrana da 0,45 µm (acetato di cellulosa o policarbonato) e acidificato fino a pH<2 con HNO_3 (6.1). L'analisi deve essere effettuata prima possibile e comunque il campione acidificato rimane stabile per almeno una settimana dal prelievo. Per la determinazione quantitativa del manganese totale si rimanda alle Sezioni 3000 e 3010.

5. Apparecchiature

5.1 Spettrofotometro di assorbimento atomico, corredato di bruciatore standard per aria-acetilene e di dispositivo per la correzione degli assorbimenti aspecifici.

5.2 Lampada a catodo cavo o altra sorgente luminosa capace di emettere lo spettro dell'elemento in esame.

6. Reattivi

Tutti i reattivi e l'acqua utilizzata per i lavaggi e la preparazione delle soluzioni di riferimento devono essere ad elevato grado di purezza.

6.1 Acido nitrico concentrato (d=1,40)

6.2 Soluzione concentrata di manganese (1000 mg/L)

Si consiglia di utilizzare soluzioni di riferimento ad elevato grado di purezza disponibili in commercio.

6.3 Soluzione diluita di manganese (10,0 mg/L)

Trasferire 1,0 mL della soluzione (6.2) in pallone tarato da 100 mL, aggiungere 1 mL di HNO_3 (6.1) e portare a volume con acqua ad elevato grado di purezza. Questa soluzione è stabi-

le per almeno un mese se conservata a 4°C in un contenitore caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli (polietilene o policarbonato) e opportunamente chiuso in modo da evitare sia l'evaporazione del solvente che eventuali contaminazioni.

7. Procedimento

7.1 Ottimizzazione dei parametri strumentali

Per migliorare le prestazioni analitiche dell'apparecchiatura e per minimizzare eventuali interferenze, procedere all'ottimizzazione dei parametri strumentali seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento o in altri protocolli standardizzati. In Tab. 1 sono elencate, a titolo di esempio, le condizioni operative tipiche per l'esecuzione delle analisi.

Tabella 1: Condizioni operative strumentali

Lunghezza d'onda (nm)	279,5
Fenditura (nm)	0,2
Correzione del fondo	attivata
Fiamma	aria-acetilene
Intensità di corrente della lampada (mA)	come da specifica

7.2 Analisi

7.2.1 Determinazione diretta

Dopo aver impostato i parametri strumentali come descritto in (7.1), costruire la curva di taratura utilizzando almeno tre soluzioni di riferimento preparate diluendo opportunamente la soluzione (6.3), in modo tale da coprire l'intero campo di indagine analitico, e il bianco dei reattivi. Ripetere la misura di ogni soluzione di riferimento compreso il bianco almeno tre volte.
Quindi, eseguire l'analisi dei campioni effettuando almeno tre letture per ogni soluzione da analizzare; si considerano accettabili i valori che forniscono un coefficiente di variazione inferiore al 5%. Le analisi dei campioni, delle soluzioni di riferimento e del bianco dei reattivi devono essere effettuate nelle stesse condizioni strumentali. Se la risposta del campione incognito analizzato cade al di fuori dell'intervallo di linearità diluire opportunamente il campione per riportarlo nel campo di linearità. Qualora risulti necessaria una diluizione del campione talmente elevata da esaltare gli errori connessi alla suddetta operazione è preferibile ripetere sia la taratura che l'analisi ricorrendo ad un'altra riga analitica meno sensibile.
Nel caso in cui sia richiesta l'analisi di un numero notevole di campioni si consiglia di controllare la taratura inserendo ogni cinque campioni una soluzione di controllo utilizzata per la taratura e verificando che il valore di quest'ultima risulti entro il ±5% del valore atteso.

7.2.2 Metodo delle aggiunte note

Il campione viene suddiviso in quattro aliquote, di cui una rimane tal quale, mentre alle altre si aggiungono concentrazioni crescenti dell'analita dello stesso ordine di grandezza di quella attesa per il campione. Misurare l'assorbanza delle quattro soluzioni e del bianco dei reattivi seguendo le indicazioni riportate al Paragrafo 7.1, avendo cura di ripetere le misure almeno tre volte. La concentrazione totale di manganese presente nelle aliquote deve comunque essere inferiore al valore limite oltre il quale la risposta strumentale non è più lineare.

8. Calcoli

8.1 Determinazione diretta

La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le concentrazioni (mg/L) delle soluzioni di riferimento in ascissa e le assorbanze corrispondenti, corrette del bianco, in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%. Calcolare quindi la concentrazione del manganese nel campione utilizzando l'equazione ottenuta dalla regressione lineare, tenendo conto dell'eventuale diluizione effettuata.

8.2 - Metodo delle aggiunte

Siano C_1, C_2, C_3, rispettivamente le concentrazioni corrispondenti alla 1ª, 2ª, 3ª aggiunta e A_0, A_1, A_2, A_3, le assorbanze del campione (A_0) e del campione addizionato delle varie aggiunte, sottratte del bianco dei reattivi. Calcolare la retta di regressione che interpola i valori di assorbanza in funzione delle concentrazioni aggiunte, attribuendo al campione incognito di assorbanza A_0 una concentrazione "aggiunta" uguale a zero. La concentrazione incognita riferita al campione sarà data dal valore dell'intercetta sull'asse (x) cambiato di segno. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%.

9. Qualità del dato

Prove effettuate (n=5) da tre laboratori su campioni di acqua di scarico ai quali sono state aggiunte quantità di manganese in modo da avere una concentrazione di 2 mg/L hanno fornito valori del coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100, compresi tra 0,7% e 1,7% ed un'accuratezza compresa tra l'1% ed il 7%.
Non essendo stati utilizzati materiali di riferimento, l'accuratezza va intesa come grado di accordo tra il risultato della misurazione e il valore di riferimento accettato.
Per acque di scarico, dopo aggiunta di quantità note di manganese tali da realizzare una concentrazione finale di 4,05 mg/L, lo Standard Methods riporta una riproducibilità del 7,8% ed un'accuratezza dell'1,3%.

Nota: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".*
Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

METODO B - Determinazione per spettrometria di assorbimento atomico con atomizzazione elettrotermica (ETA-AAS)

1. Principio del metodo

Il manganese viene determinato per iniezione diretta del campione nel fornetto di grafite di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico. Dalla misura del segnale di assorbanza a 279,5 nm si ricava la concentrazione mediante confronto con una curva di taratura ottenuta con soluzioni a concentrazioni note di analita, comprese nel campo di indagine analitico.

2. Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione del manganese in campioni di acque naturali e di scarico nell'intervallo di concentrazione da 0,5 a 10,0 µg/L. Per concentrazioni superiori a 10 µg/L è possibile rientrare nell'intervallo indicato ricorrendo alla diluizione del campione.
Effettuando 10 determinazioni su uno stesso campione avente un contenuto di manganese pari a 0,5 µg/L, alternate con una misura del bianco, si è potuto calcolare un limite di rivelabilità, espresso come tre volte lo scarto tipo, di 0,05 µg/L (volume iniettato: 25 µL di campione e 25 µL di modificante). Tale limite dipende dalla matrice e dalle condizioni strumentali applicate; può essere leggermente migliorato aumentando il volume di campione iniettato. Tuttavia applicando queste modalità vengono esaltati gli effetti delle specie interferenti.

3. Interferenze e cause di errore

L'utilizzo del correttore di fondo consente di minimizzare gli assorbimenti aspecifici eventualmente presenti. Nel caso in cui si debba determinare l'analita in una matrice sconosciuta o scarsamente caratterizzata è consigliabile ricorrere al metodo delle aggiunte note. Tale metodo permette di minimizzare le interferenze di tipo fisico e/o chimico eventualmente presenti. Il ricorso ad un idoneo modificatore consente di rendere la matrice più volatile o di formare composti più stabili con l'elemento in esame; mediante un opportuno ciclo elettrotermico è possibile allontanare la matrice senza perdere l'analita di interesse.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". In particolare, considerando le basse concentrazioni da determinare, si consiglia di conservare i campioni in bottiglie di polipropilene o altro materiale caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli, precedentemente trattate con HNO_3 1 M per una notte e successivamente neutralizzate con acqua ad elevato grado di purezza. Per determinare soltanto il manganese disciolto, il campione viene filtrato dopo il prelievo su membrana da 0,45 µm (acetato di cellulosa o policarbonato) e acidificato fino a pH<2 con HNO_3 (6.1). L'analisi deve essere effettuata prima possibile e comunque il campione acidificato rimane stabile per almeno una settimana dal prelievo. Per la determinazione quantitativa del manganese totale si rimanda alle Sezioni 3000 e 3010.
È buona norma considerare sempre l'opportunità di predisporre un "bianco di campo", ottenuto semplicemente mediante lo stoccaggio di un'aliquota di acqua ultrapura in un recipiente identico a quello dei prelievi, da sottoporre successivamente a tutte le fasi analitiche previste per i campioni. Altri sistemi di controllo della qualità del campionamento consistono nell'uso di campioni replicati, nell'attivazione di precauzioni per proteggere i campioni in modo da evitare qualsiasi possibile contaminazione, nell'avvinamento regolare dei recipienti.

5. Apparecchiature

5.1 Spettrofotometro di assorbimento atomico, corredato di fornetto di grafite e di dispositivo per la correzione degli assorbimenti aspecifici.

5.2 Lampada a catodo cavo o altra sorgente luminosa capace di emettere lo spettro dell'elemento in esame.

5.3 Autocampionatore oppure micropipette tarate per il dosaggio di pochi µL.

5.4 Dispositivo per la registrazione dell'assorbanza, adatto ad evidenziare la forma del picco.

5.5 Dispositivo che fornisce argon ultrapuro

6. Reattivi

Tutti i reattivi e l'acqua utilizzata per i lavaggi e la preparazione delle soluzioni di riferimento devono essere ad elevato grado di purezza.

6.1 Acido nitrico concentrato (d=1,40)

6.2 Soluzione concentrata di manganese (1000 mg/L)

Si consiglia di utilizzare soluzioni di riferimento ad elevato grado di purezza disponibili in commercio.

6.3 Soluzione diluita di manganese (2,0 mg/L)

Trasferire 200 µL della soluzione (6.2) in pallone tarato da 100 mL, aggiungere 1 mL di HNO_3 (6.1) e portare a volume con acqua ad elevato grado di purezza. Questa soluzione è stabile per almeno un mese se conservata a 4°C in un contenitore caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli (polietilene o policarbonato) e opportunamente chiuso in modo da evitare sia l'evaporazione del solvente che eventuali contaminazioni.

6.4 Modificatore di matrice $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$

Sciogliere 0,3455 g di $Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ di grado ultrapuro in acqua deionizzata e portare a volume in matraccio tarato da 100 mL in polietilene. È possibile utilizzare anche altri modificatori seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento.

7. Procedimento

7.1 Ottimizzazione dei parametri strumentali

Per migliorare le prestazioni analitiche dell'apparecchiatura e per minimizzare eventuali interferenze, procedere all'ottimizzazione dei parametri strumentali seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento o in altri protocolli standardizzati. In Tabb. 1-2 sono elencate, a titolo di esempio, le condizioni operative tipiche per l'esecuzione delle analisi.

Tabella 1: Condizioni operative strumentali

Lunghezza d'onda (nm)	279,5
Fenditura (nm)	0,2
Rilevazione del segnale	altezza o area del picco
Correzione del fondo	attivata
Tubo	pirolitico
Intensità di corrente della lampada (mA)	come da specifica
Volume del campione (µL)	25
Volume del modificante di matrice (µL)	25

Il ciclo elettrotermico riportato è valido nel caso in cui si utilizzi un tubo di grafite pirolitica; in tutti gli altri casi andrà ottimizzato, prendendo come riferimento quello generalmente consigliato dal manuale d'uso fornito a corredo dell'apparecchiatura.

Tabella 2: Programma termico

	T°C	RT	HT	G	R
Essiccamento	120	20	20	300	
Incenerimento	1400	40	20	300	
Atomizzazione	2400	0	5	0	*
Pulizia	2600	1	5	300	

RT = tempo in secondi della rampa di temperatura
HT = tempo in secondi di permanenza alla temperatura impostata (isoterma)
T°C = temperatura impostata in °C
G = flusso del gas di lavaggio (argon ultrapuro) in mL/minuto
R = attivazione della lettura in atomizzazione.

7.2 Analisi

7.2.1 Determinazione diretta

Dopo aver impostato i parametri strumentali come descritto in (7.1), costruire la curva di taratura utilizzando almeno tre soluzioni di riferimento scelte nel campo di indagine analitico, preparate diluendo opportunamente la soluzione (6.3), e il bianco dei reattivi. Ripetere la misura di ogni soluzione di riferimento compreso il bianco almeno tre volte.
Quindi, eseguire l'analisi dei campioni effettuando almeno tre letture per ogni soluzione da analizzare; si considerano accettabili i valori che forniscono un coefficiente di variazione inferiore al 10%. Le analisi dei campioni, delle soluzioni di riferimento e del bianco dei reattivi devono essere effettuate nelle stesse condizioni strumentali. Se la risposta del campione incognito analizzato cade al di fuori dell'intervallo di linearità, diluire opportunamente il campione per riportarlo nel campo di linearità.Qualora risulti necessaria una diluizione del campione talmente elevata da esaltare gli errori connessi alla suddetta operazione è preferibile ripetere sia la taratura che l'analisi riducendo la quantità di campione iniettato nel fornetto di grafite oppure aumentando il flusso di gas di lavaggio in atomizzazione.
Nel caso in cui sia richiesta l'analisi di un numero notevole di campioni si consiglia di controllare la taratura inserendo ogni cinque campioni una soluzione di controllo utilizzata per la taratura e verificando che il valore di quest'ultima risulti entro il ±5% del valore atteso.

7.2.2 Metodo delle aggiunte note

Il campione viene suddiviso in quattro aliquote, di cui una rimane tal quale, mentre alle altre si aggiungono concentrazioni crescenti dell'analita dello stesso ordine di grandezza di quella attesa per il campione. Misurare l'assorbanza delle quattro soluzioni e del bianco dei reattivi seguendo le indicazioni riportate al Paragrafo 7.1, avendo cura di ripetere le misure almeno tre volte. La concentrazione totale di manganese presente nelle aliquote non deve superare il valore limite oltre il quale la risposta strumentale non è più lineare.

8. Calcoli

8.1 Determinazione diretta

La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le concentrazioni (µg/L) delle soluzioni di riferimento in ascissa e le assorbanze corrispondenti, corrette del bianco, in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%. Calcolare quindi la concentrazione del manganese nel campione utilizzando l'equazione ottenuta dalla regressione lineare, tenendo conto dell'eventuale diluizione effettuata.

8.2 Metodo delle aggiunte

Siano C_1, C_2, C_3, rispettivamente le concentrazioni corrispondenti alla 1ª, 2ª, 3ª aggiunta e A_0, A_1, A_2, A_3, le assorbanze del campione (A_0) e del campione addizionato delle varie aggiunte, sottratte del bianco dei reattivi. Calcolare la retta di regressione che interpola i valori di assorbanza in funzione delle concentrazioni aggiunte, attribuendo al campione incognito di assorbanza A_0 una concentrazione "aggiunta" uguale a zero. La concentrazione incognita riferita al campione sarà data dal valore dell'intercetta sull'asse (x) cambiato di segno. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%.

9. Qualità del dato

Prove effettuate in quintuplicato da quattro laboratori su soluzioni sintetiche in acqua deionizzata hanno fornito i seguenti risultati:

Concentrazione attesa (µg/L)	5,0	20,0
Concentrazione trovata (µg/L)*	4,6 ± 0,5	19,2 ± 1,4
CV (%) intralaboratorio	1,1	2,6
CV (%) interlaboratorio	10,9	7,3
Accuratezza (%)**	8,0	4,0

** valor medio ± scarto tipo*
CV (%) = coefficiente di variazione; CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100
*** Non essendo stati utilizzati materiali di riferimento, l'accuratezza va intesa come grado di accordo tra il risultato della misurazione e il valore di riferimento accettato.*

Va tenuto presente che la precisione e accuratezza di un metodo generalmente peggiorano all'aumentare della complessità della matrice. L'EPA in uno studio condotto tra dieci laboratori riporta per campioni di acque di scarico, ad una concentrazione di 9,1 µg/L, una precisione del singolo analista pari al 27%, una precisione totale del 46% ed un'accuratezza del 64%.

Nota: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".*
Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza standard ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA), 3-12/3-31.

IRSA (1986 a): "I metalli nelle acque: origine, distribuzione, metodi di rimozione", Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **71**, 21-22.

IRSA (1986 b): "Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **75**, 263-278.

UNICHIM (1995): "*Linee Guida per la taratura della strumentazione analitica - Spettrometri di assorbimento atomico a fiamma (FAAS)*", Manuale 177/1, Milano.

UNICHIM (1996): "*Linee Guida per la taratura della strumentazione analitica – Spettrometri di assorbimento atomico ad atomizzazione elettrotermica (EAAS)*", Manuale 177/2, Milano.

3200. Mercurio

Il mercurio è caratterizzato da un tenore medio nella crosta terrestre di circa 0,08 ppm. Per le sue proprietà chimico-fisiche il mercurio è largamente utilizzato in campo industriale. Il principale impiego dell'elemento è nell'industria del cloro e degli alcali (dove il mercurio è utilizzato da catodo nelle celle elettrolitiche), nella produzione di barometri, lampade, batterie, nelle applicazioni medicinali e nella fabbricazione della carta e di polveri detonanti.
Esiste in tre stabili stati di ossidazione: (0), (I) e (II). La speciazione dell'elemento è influenzata da diversi fattori quali pH, potenziale redox e presenza di complessanti inorganici e organici. Il mercurio (II), ad esempio, forma complessi stabili con i cloruri ma anche con cisteina, amminoacidi e acidi idrossicarbossilici. Una frazione significativa del mercurio nelle acque naturali è associata ai solidi sospesi (30-80%), dando luogo ad un rilevante trasporto solido per questo elemento. A livello del sedimento, il mercurio può reagire con i solfuri formando HgS insolubile; questo importante meccanismo detossificante può, però, essere annullato dalla riossigenazione del sedimento a seguito di risospensione e/o movimentazione di materiali sedimentati. Un secondo importante meccanismo di rimozione dalla fase acquosa del mercurio è costituito dalla volatilizzazione dell'elemento.
Nei sedimenti, oltre che come solfuro, il mercurio può essere presente come mercurio metallico o come specie organica ed inorganica adsorbita; composti metallorganici possono essere prodotti a seguito di processi biologici ed alcuni di questi possono essere parzialmente rilasciati alla colonna d'acqua. Nella maggior parte delle acque naturali il metilmercurio costituisce solo una piccola parte del mercurio totale (<1%). Intervalli tipici per le acque naturali sono 0,5-10 ng/L per il mercurio disciolto e 1-20 ng/L per il mercurio totale.
L'allegato 2 sez. B del D.L. 152/99, inerente i requisiti di qualità delle acque idonee alla vita dei pesci, introduce limiti più restrittivi per il mercurio rispetto alla disciplina sugli scarichi: 0,5 μg/L come valore imperativo e 0,05 μg/L come valore guida. Obiettivi di qualità ancor più stringenti sono quelli previsti dal decreto di salvaguardia della laguna di Venezia (0,005 μg/L per il bacino scolante; 0,003 μg/L e 0,001 μg/L, valori imperativo e guida, rispettivamente, per la laguna).
Il D.Lgs. 152/99 in materia di tutela delle acque dall'inquinamento prevede criteri di qualità diversificati in funzione degli usi (1 μg/L per le acque sotterranee; un valore guida di 0,5 μg/L ed uno imperativo di 1 μg/L per le acque superficiali destinate alla potabilizzazione; un valore per il mercurio totale di 0,5 μg/L per le acque idonee alla vita dei pesci). Il D.Lgs. 31/2001 concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano fissa una concentrazione massima ammissibile di 1 μg/L.
La spettrometria di assorbimento atomico a vapori freddi (CV-AAS) rappresenta ancora la tecnica più conveniente e diffusa per la determinazione del mercurio. Il mercurio (II) ottenuto dal trattamento preliminare di ossidazione del campione viene ridotto a mercurio elementare, vaporizzato in un sistema a circolazione chiusa e quindi trasferito mediante un gas inerte nella cella di misura.
Nel seguito vengono descritte tre procedure analitiche, la prima (metodo A1) basata sulla tradizionale ossidazione del mercurio con una miscela di permanganato di potassio e persolfato di potassio e riduzione con cloruro di stagno (II), la seconda (metodo A2) basata su una rapida ossidazione preliminare (10 minuti) del mercurio in forno a microonde e successiva riduzione mediante sodio boroidruro. Questa seconda procedura prevede l'utilizzo di due configurazioni strumentali (sistema "batch" oppure "Flow Injection Analysis System", FIAS). Il ricorso a successivi arricchimenti del mercurio su una retina di oro (metodo A3) consente la determinazione dell'analita a livelli di pochi ng/L.

METODO A1 – Metodo di ossidazione per via umida e determinazione mediante spettrometria di assorbimento atomico a vapori freddi (CV-AAS)

1. Principio del metodo

Il metodo si avvale di una ossidazione chimica per via umida, che trasforma tutto il mercurio a mercurio (II), seguita da una riduzione a mercurio metallico. Il mercurio elementare, vaporizzato in un sistema a circolazione chiusa, attraversa una cella collocata lungo il cammino ottico dello spettrofotometro di assorbimento atomico e viene determinato alla lunghezza d'onda di 253,7 nm.

2. Campo di applicazione

Questo metodo consente la determinazione del mercurio totale, presente sia nelle acque naturali che negli scarichi urbani e industriali, nell'intervallo di concentrazione da 0,5 a 10,0 µg/L. Effettuando 10 determinazioni su uno stesso campione avente un contenuto di mercurio pari a 0,5 µg/L, si è potuto calcolare un limite di rivelabilità, espresso come tre volte lo scarto tipo, di 0,10 µg/L.

3. Interferenze e cause di errore

I solfuri possono interferire a concentrazioni superiori a 20 mg/L. In tal caso è necessario aggiungere una maggiore quantità di soluzione ossidante.
Il rame può interferire se presente in concentrazioni superiori a 20 mg/L. Anche in tal caso è necessario aggiungere una maggiore quantità di soluzione ossidante.
Le acque di scarico industriali e salmastre, ricche di cloruri, richiedono l'aggiunta di una maggiore quantità di permanganato di potassio. In questo caso però anche i cloruri vengono ossidati a cloro libero, che assorbe alla stessa lunghezza d'onda dei vapori di mercurio (253 nm). Diventa pertanto obbligatoria l'eliminazione del cloro libero dallo spazio morto nel recipiente di aerazione, prima che si proceda alla riduzione e successiva evaporazione del mercurio nella cella.
La presenza di alcune sostanze organiche volatili, non ossidabili nelle condizioni del metodo, che assorbono alla lunghezza d'onda prevista dal metodo, possono dar luogo ad interferenze positive.
Possono essere causa di interferenze negative quei metalli che, quando vengono ridotti allo stato elementare dal cloruro di stagno (II) formano amalgame stabili con il mercurio (ad esempio selenio, oro, platino e palladio.
La presenza di bromuri può causare interferenze negative a concentrazioni superiori a 2÷3 g/L, mentre gli ioduri danno lo stesso tipo di interferenze già alla concentrazione di 2 mg/L.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il prelievo e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".
In particolare i campioni debbono essere stabilizzati aggiungendo, per ogni di campione, 5 mL di HNO_3 (6.2) e 10 mL di $KMnO_4$ (6.5).
Prima di procedere al prelievo per l'analisi, eventuali depositi di MnO_2, che adsorbono mercurio sottraendolo alla determinazione, debbono essere solubilizzati con aggiunta di cloridrato di idrossilammina (6.4).
Per una lunga conservazione (circa 3 mesi) è consigliabile addizionare ad ogni litro di campione 50 mL di soluzione stabilizzante (6.10) in luogo della soluzione (6.5).
Se si vuole determinare il solo mercurio disciolto il campione viene filtrato attraverso un filtro

a membrana da 0,45 µm prima di effettuare l'aggiunta dei relativi stabilizzanti (6.5 e 6.10). Si consiglia di conservare i campioni in contenitori di vetro, possibilmente di tipo Pyrex.

5. Apparecchiature

5.1 Apparecchiatura per la determinazione del mercurio (Fig. 1), costituita da:

5.1.1 Spettrofotometro di assorbimento atomico (D) corredato possibilmente di dispositivo per la correzione dell'assorbimento non specifico: in particolare qualsiasi strumento che consenta il montaggio della cella di misura dei vapori di Hg, oppure qualsiasi spettrofotometro analizzatore di vapori di Hg, corredato possibilmente anche di sistema di intrappolamento vapori (vedi Appendice).

5.1.2 Lampada a catodo cavo a mercurio (G), oppure del tipo senza elettrodi (EDL).

5.1.3 Registratore (R) con varie possibilità di fondo scala e con velocità variabile di scorrimento della carta, compatibile con il sistema di rivelazione UV.

5.1.4 Cella di misura (C): possono essere usate celle con cammino ottico di 10÷16 cm e con finestre di quarzo o di materiale trasparente a 253,7 nm. Per la loro costruzione può essere utilizzato il metilmetacrilato (plexiglas) (diametro esterno del tubo: 25 mm; lunghezza: 100-160 mm). L'ingresso e l'uscita del gas (anche questi ultimi in tubo di quarzo o plexiglas di 6 mm di diametro esterno) sono sistemate a 12÷13 mm da ciascuna estremità. La cella è fissata alla camera del bruciatore ed allineata con il fascio di luce in modo da dare la massima trasmittanza.

5.1.5 Pompa dell'aria (H): qualsiasi pompa peristaltica capace di erogare circa 2 L di aria per minuto in maniera costante.

5.1.6 Flussimetro (F): qualsiasi tipo purché in grado di misurare in modo riproducibile flussi dell'ordine di 2 litri/minuto.

5.1.7 Tubo di aerazione (B): tubo di vetro provvisto di diffusore in vetro sinterizzato con pori sufficientemente grandi (porosità 100÷250 µm). Il passaggio del vapore di mercurio dal recipiente contenente il campione alla cella è realizzato con tubo di cloruro di polivinile.

5.1.8 Tubo di essiccamento (E): tubo di circa 150 mm x 18 mm diametro esterno, riempito con 20 g di perclorato di magnesio [$(Mg(ClO_4)_2$]. È consigliabile il riempimento secondo il seguente schema: lana di vetro=12 mm / perclorato di magnesio=38 mm / gel di silice con indicatore=6 mm / lana di vetro=12 mm (vedi Appendice A1, punto a).

5.1.9 Trappola di vetro a carbone attivo (T) per fissare i vapori di mercurio, riempita secondo il seguente schema: lana di vetro 25=mm/carbone attivo=25 mm/lana di vetro=25 mm.

5.1.10 Recipiente di reazione (A): recipiente di vetro al borosilicato, di 200÷300 mL di capacità (ad es. bottiglia per BOD).

5.2 Bagno termostatico a 95±2°C

5.3 Normale vetreria di laboratorio preparata come descritto in Appendice A 1, punto c.

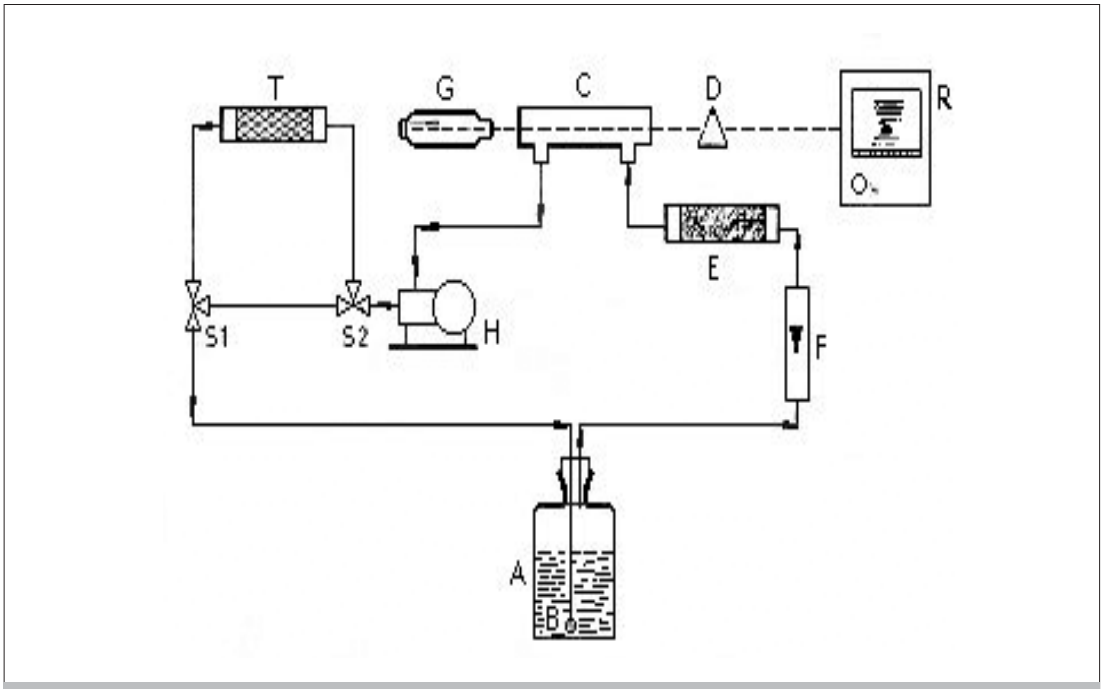


Figura 1: Schema di apparecchiatura per la determinazione del mercurio senza fiamma. A: Recipiente di reazione; B: Tubo con diffusore di vetro sinterizzato; C: Cella di misura; D: Rivelatore ad assorbimento atomico; E: Tubo di essiccamento; F: Flussimetro; G: Lampada a catodo cavo; H: Pompa dell'aria; T: Tubo a carbone attivo; R: Registratore; S_1S_2: Rubinetti a 3 vie.

6. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere di grado ultrapuro. L'acqua indicata nel seguito deve essere distillata e/o deionizzata.

6.1 Acido solforico concentrato (d=1,84)

6.2 Acido nitrico concentrato (d=1,42)

6.3 Soluzione di cloruro di stagno (II) (100 g/L)

Introdurre 25 g di cloruro di stagno (II) diidrato ($SnCl_2 \cdot 2H_2O$) e 50 mL di HCl (6.7) in un matraccio da 250 mL e portare a volume con acqua.
Far gorgogliare azoto attraverso la soluzione per 30 minuti per rimuovere eventuali tracce di Hg.

6.4 Soluzione di cloridrato di idrossilammina (120 g/L)

Sciogliere 12 g di cloruro di sodio e 12 g di cloridrato di idrossilammina ($NH_2OH \cdot HCl$) in acqua e diluire a 100 mL.

6.5 Soluzione di permanganato di potassio (50 g/L)

Sciogliere 50 g di permanganato di potassio ($KMnO_4$) in acqua e diluire a 1000 mL.

6.6 Soluzione di persolfato di potassio (50 g/L)

Sciogliere 50 g di persolfato di potassio ($K_2S_2O_8$) in acqua e diluire a 1000 mL.

6.7 Acido cloridrico concentrato (d=1,19)

6.8 Soluzione concentrata di mercurio (1 mL=1,00 mg di Hg)

Si consiglia di utilizzare soluzioni di riferimento ad elevato grado di purezza disponibili in commercio.
In alternativa, sciogliere 0,1354 g di cloruro di mercurio (II) ($HgCl_2$) in circa 70 mL di acqua, aggiungere 1 mL di acido nitrico concentrato (6.2) e portare a volume di 100 mL con acqua. Le soluzioni di riferimento per la curva di taratura si ottengono per diluizioni successive della soluzione precedente, con acqua contenente HNO_3 all'1%. Preparare almeno tre soluzioni di riferimento nel campo di applicabilità del metodo. Queste soluzioni vanno preparate giornalmente. È consigliabile preparare giornalmente, diluendo opportunamente la soluzione concentrata, una soluzione diluita di mercurio a concentrazione di 0,1 mg/L.

6.9 Soluzione ossidante per il lavaggio della vetreria

Sciogliere 100 g di dicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$) in 1000 mL di acido solforico circa 2,5 M.

6.10 Soluzione stabilizzante

Sciogliere 4 g di dicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$) in 1000 mL di acido nitrico circa 5 M.

7. Procedimento

7.1 Taratura

In 4 contenitori (5.1.10) introdurre, ad esempio, 1,0 mL; 2,0 mL; 5,0 mL e 10,0 mL della soluzione diluita di mercurio (6.8) e aggiungere acqua fino ad ottenere un volume di 100 mL; in un altro contenitore preparare un bianco introducendo 100 mL di acqua; agitare ed aggiungere 5 mL di H_2SO_4 concentrato (6.1) e 2,5 mL di HNO_3 concentrato (6.2), quindi addizionare 15 mL di soluzione di $KMnO_4$ (6.5) in ogni contenitore ed attendere per 15 minuti.
Aggiungere 10 mL di persolfato di potassio (6.6) e riscaldare per due ore in bagno termostatico a 95°C. Raffreddare e aggiungere 5 mL di soluzione di cloridrato di idrossilammina (6.4) per ridurre l'eccesso di ossidanti.
Attendere 30 secondi dopo la decolorazione, aggiungere 2 mL della soluzione di cloruro di stagno (II) (6.3) e collegare rapidamente il contenitore al sistema di aerazione (vedi schema Fig. 1). La pompa per la circolazione dell'aria viene preventivamente regolata per funzionare ad un flusso di 1 litro/minuto.
Eseguire la lettura quando il valore dell'assorbanza rimane costante per circa 15÷20 secondi.
Dopo aver deviato il flusso, tramite i rubinetti S_1 e S_2, attraverso il filtro a carbone (5.1.9) continuare l'aerazione fino a quando l'assorbanza ritorna al valore zero. Quindi riportare i rubinetti S_1 e S_2 nella posizione di misura.
Procedere con le altre soluzioni a concentrazione nota e costruire la curva di taratura, riportando su un grafico, in ascissa i valori delle quantità di Hg in µg ed in ordinata i corrispondenti valori delle assorbanze, corrette del valore del bianco.

7.2 Determinazione

Trasferire 100 mL del campione (o una aliquota «V» diluita a 100 mL) nel contenitore (5.1.10). Aggiungere 5 mL di H_2SO_4 (6.1)e 2,5 mL di HNO_3 (6.2), agitando dopo ogni aggiunta. Aggiungere 15 mL di soluzione di permanganato di potassio (6.5). Per i campioni di acqua di scarico può essere necessario aggiungere un volume maggiore di soluzione di permanganato sino a persistenza del colore rosso-porpora per almeno 15 minuti.

Aggiungere 10 mL di soluzione di persolfato di potassio (6.6) e riscaldare per 2 ore in bagno termostatico a 95°C. Raffreddare e aggiungere 5 mL di cloridrato di idrossilammina (6.4) per ridurre l'eccesso di ossidanti e gli eventuali depositi di MnO_2.
Attendere 30 secondi, aggiungere 2 mL di cloruro di stagno (II) (6.3) e collegare rapidamente il contenitore al sistema di aerazione.
Eseguire la lettura quando il valore dell'assorbanza rimane costante per circa 15÷20 secondi.
Dopo aver deviato il flusso, tramite i rubinetti S_1 e S_2, attraverso il filtro a carbone (5.1.9) continuare l'aerazione fino a quando l'assorbanza ritorna al valore zero. Quindi riportare i rubinetti S_1 e S_2 nella posizione di misura.

8. Calcoli

Dal valore dell'assorbanza ottenuta per il campione di acqua in esame, ricavare dalla curva di taratura la quantità in µg di Hg (a).
Calcolare la concentrazione C del mercurio, in µg/L, nel campione con la relazione:

$$C = \frac{(a - a_0) \cdot 1000}{V}$$

dove:
a = µg di Hg ricavati dalla curva di taratura;
a_0 = µg di Hg nel bianco dei reattivi;
V = volume (mL) di campione sottoposto all'analisi.

9. Qualità del dato

Prove effettuate (n=5) da tre laboratori su soluzioni sintetiche di acqua deionizzata contenenti 1 µg/L di Hg hanno fornito un valore del coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100, pari al 21%, mentre l'accuratezza è risultata pari al 2,4%.
Va tenuto presente che la precisione e accuratezza di un metodo generalmente peggiorano all'aumentare della complessità della matrice. Non essendo stati utilizzati materiali di riferimento, l'accuratezza va intesa come grado di accordo tra il risultato della misurazione e il valore di riferimento accettato.

Nota: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".*
Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

APPENDICE A1

a) Cambiare il riempimento del tubo di essiccamento (Fig. 1, E) quando il perclorato di magnesio appare molto impaccato. Cambiare il gel di silice non appena appare la colorazione rosa.
b) Ripetere sempre la taratura dopo la sostituzione dell'essiccante.
c) Lavare la vetreria con soluzione ossidante (6.9). Sciacquare con acqua. Non usare solventi per l'essiccamento.

Al fine di evitare inquinamenti, tenere tutta la vetreria necessaria per la determinazione del mercurio, ben separata dalla vetreria normalmente impiegata in laboratorio.

METODO A2 – Ossidazione in forno a microonde e determinazione per spettrometria di assorbimento atomico a vapori freddi (CV-AAS)

1. Principio del metodo

Il mercurio viene determinato mediante spettrometria di assorbimento atomico a vapori freddi (CV-AAS) alla lunghezza d'onda di 253,7 mm utilizzando due possibili configurazioni strumentali: sistema "batch" oppure "flow injection". Il metodo si avvale di una ossidazione chimica in forno a microonde in cui avviene la decomposizione della sostanza organica e dei composti organomercurici (eventualmente presenti) e la trasformazione di tutto il mercurio presente a mercurio (II). Successivamente il mercurio (II), ridotto dal sodio boroidruro a mercurio elementare, viene vaporizzato in un sistema a circolazione chiusa e quindi trasferito mediante un gas inerte nella cella di misura.

2. Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione del mercurio totale in campioni di acque di scarico e naturali (dolci e di mare) nell'intervallo di concentrazione da 0,5 a 50 µg/L. Per concentrazioni superiori a 50 µg/L è possibile rientrare nell'intervallo indicato ricorrendo alla diluizione del campione.
Effettuando 10 determinazioni su uno stesso campione avente un contenuto di mercurio pari a 0,5 µg/L, alternate con una misura del bianco, si è potuto calcolare un limite di rivelabilità, espresso come tre volte lo scarto tipo, di 0,1 µg/L.

3. Interferenze e cause di errore

Sostanze organiche volatili, eventualmente presenti, possono essere eliminate nella fase di "stripping" che precede la riduzione. In tale fase viene eliminato anche l'eventuale cloro che può essere presente. La incompleta eliminazione di questi composti (sostanze organiche volatili e cloro libero) è causa di interferenza positiva poiché assorbono alla stessa lunghezza d'onda dei vapori del mercurio (253,7 nm).
L'utilizzo del correttore di fondo consente di minimizzare gli assorbimenti aspecifici eventualmente presenti. Nel caso in cui si debba determinare l'analita in una matrice sconosciuta o scarsamente caratterizzata è consigliabile ricorrere al metodo delle aggiunte note. Tale metodo permette di minimizzare le interferenze di matrice.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". In particolare, considerando le basse concentrazioni da determinare, si consiglia di conservare i campioni in bottiglie di polipropilene o policarbonato o altro materiale caratterizzato da scarse proprietà di cessione o adsorbimento di metalli, precedentemente trattate con HNO_3 1 M per una notte e successivamente neutralizzate con acqua ad elevato grado di purezza.
In particolare i campioni debbono essere stabilizzati aggiungendo, subito dopo il prelievo 1 mL di HNO_3 (6.1) per ogni 100 mL di campione. Qualora si voglia determinare il solo mercurio disciolto il campione viene filtrato dopo il prelievo su membrana da 0,45 µm (acetato

di cellulosa o policarbonato) prima di effettuare l'aggiunta di HNO_3. L'analisi deve essere effettuata prima possibile e comunque il campione acidificato rimane stabile per almeno una settimana dal prelievo. Per una lunga conservazione del campione si consiglia di acidificare come descritto in precedenza e quindi congelare.
È buona norma considerare sempre l'opportunità di predisporre un "bianco di campo", ottenuto semplicemente mediante lo stoccaggio di un'aliquota di acqua ultrapura in un recipiente identico a quello dei prelievi, da sottoporre successivamente a tutte le fasi analitiche previste per i campioni. Altri sistemi di controllo della qualità del campionamento consistono nell'uso di campioni replicati, nell'attivazione di precauzioni per proteggere i campioni in modo da evitare qualsiasi possibile contaminazione, nell'avvinamento regolare dei recipienti.

5. Apparecchiature

5.1 Spettrofotometro di assorbimento atomico, che consenta il montaggio del sistema "batch" e del sistema "flow injection", corredato di dispositivo per la correzione degli assorbimenti aspecifici e possibilmente di sistema di intrappolamento dei vapori (vedi Appendice).

5.2 Lampada a catodo cavo o altra sorgente luminosa capace di emettere lo spettro dell'elemento in esame.

5.3 *Cella di misura* in vetro o quarzo con finestre di quarzo o altro materiale trasparente a 253,7 nm.

La cella di misura è fissata alla camera del bruciatore e mantenuta a temperatura ambiente; negli strumenti moderni può essere riscaldata a una temperatura di 200°C tramite un apposito fornetto elettrico al fine di prevenire eventuali condense dei vapori di mercurio durante la fase di lettura. La cella è allineata con la radiazione emessa dalla lampada a mercurio.

5.4 Sistema "batch" (vedi Fig. 1)

5.5 Sistema "flow injection" (vedi Fig. 2)

5.6 Forno a microonde, capace di generare una potenza di almeno 600 W e possibilmente in grado di monitorare sia la pressione che la temperatura all'interno dei recipienti utilizzati per la mineralizzazione.

5.7 Dispositivo che fornisce argon ultrapuro

6. Reattivi

Tutti i reattivi e l'acqua utilizzata per i lavaggi e la preparazione delle soluzioni di riferimento devono essere ad elevato grado di purezza.

6.1 Acido nitrico concentrato (d=1,40) di grado ultrapuro.

6.2 Acido cloridrico concentrato (d=1,19) di grado ultrapuro.

6.3 Soluzione di $NaBH_4$ al 3% in NaOH all'1% per sistema "batch".

Sciogliere 10 grammi di NaOH di grado ultrapuro in matraccio di polietilene da 1 litro contenente circa 500 mL di H_2O ed aggiungere gradualmente e sotto agitazione 30 grammi di $NaBH_4$, quindi portare a volume con acqua. La soluzione così preparata è stabile per circa una settimana se conservata a temperatura non superiore a 4°C.

6.4 Soluzione di $NaBH_4$ (0,2 %) in NaOH (0,05%) per sistema "flow injection".

Sciogliere 0,5 grammi di NaOH di grado ultrapuro in matraccio di polietilene da 1 litro contenente circa 500 mL di H_2O ed aggiungere gradualmente e sotto agitazione 2 grammi di $NaBH_4$, quindi portare a volume con acqua. La soluzione così preparata è stabile per circa una settimana.

Nota: *il sodio boroidruro libera idrogeno a contatto con acido, dovrà pertanto essere maneggiato con cura e conservato secondo le indicazioni del fornitore.*

6.5 Soluzione concentrata di mercurio (1 mg/mL)

Si consiglia di utilizzare soluzioni di riferimento ad elevato grado di purezza disponibili in commercio.
Le soluzioni di riferimento per la curva di taratura si ottengono per diluizioni successive della soluzione precedente, con acqua contenente HNO_3 all'1%. Preparare almeno tre soluzioni di riferimento nel campo di applicabilità del metodo.

7. Procedimento

7.1 Mineralizzazione con microonde in presenza di acido nitrico

La procedura di mineralizzazione è basata sull'esposizione controllata alle microonde di campioni in presenza di acido nitrico. Trasferire le soluzioni (campioni e bianchi) acidificate con HNO_3 (concentrazione finale di acido 1 M, compresa l'aggiunta effettuata all'atto del prelievo) in contenitori di teflon PFA chiusi ermeticamente e procedere alla mineralizzazione per almeno 10 minuti erogando una potenza variabile tra 250 e 600 W.
Il volume di campione da sottoporre a mineralizzazione, la durata della stessa e la potenza erogata dovranno tuttavia essere ottimizzati in funzione della strumentazione disponibile e della particolare matrice analizzata. Nel seguito vengono riportate, a titolo esemplificativo, le condizioni operative tipiche di due sistemi a microonde, uno dotato di controllo della temperatura applicata e l'altro che si basa sulla variazione delle potenze erogate.

Microonde con controllo della temperatura

Stadio	Potenza (Watt)	Tempo (min)	Temperatura (°C)
1	250	2	80
2	400	3	130
3	600	5	170

Microonde con controllo delle potenze erogate

Stadio	Potenza (Watt)	Tempo (min)
1	250	2
2	400	3
3	600	3
4	0	1
5	600	2

In entrambi i casi sono stati utilizzati contenitori a media pressione (max 30 bar) in teflon, "liner" interno di capacità da 45 mL (massimo volume consigliato 15 mL).
Qualora risulti necessario lavorare in condizioni diverse da quelle descritte nel metodo (per esempio trattare campioni ad elevato carico organico), utilizzare, ad esempio, digestori in teflon capaci di sopportare pressioni più elevate (≥250 psi), allungare i tempi di esposizione

alle microonde, aumentare la concentrazione di HNO_3 (oltre 2 M) e aggiungere una soluzione di $KMnO_4$ (in modo da ottenere una concentrazione di 0,05 M).

7.1.1 Ottimizzazione dei parametri strumentali per sistema "batch"

Per migliorare le prestazioni analitiche dell'apparecchiatura e per minimizzare eventuali interferenze procedere all'ottimizzazione dei parametri strumentali, seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento. In Tabb. 1-2 sono elencate, a titolo di esempio, le condizioni operative tipiche per l'esecuzione delle analisi con il sistema "batch" (Fig. 1).

Tabella 1: Condizioni operative strumentali per il sistema batch

Lunghezza d'onda (nm)	253,7
Fenditura (nm)	0,7
Rilevazione del segnale	altezza o area del picco
Correzione del fondo	attivata
Intensità di corrente della lampada (mA)	come da specifica
Volume del campione (mL)	10
Volume $NaBH_4$ (mL)	4

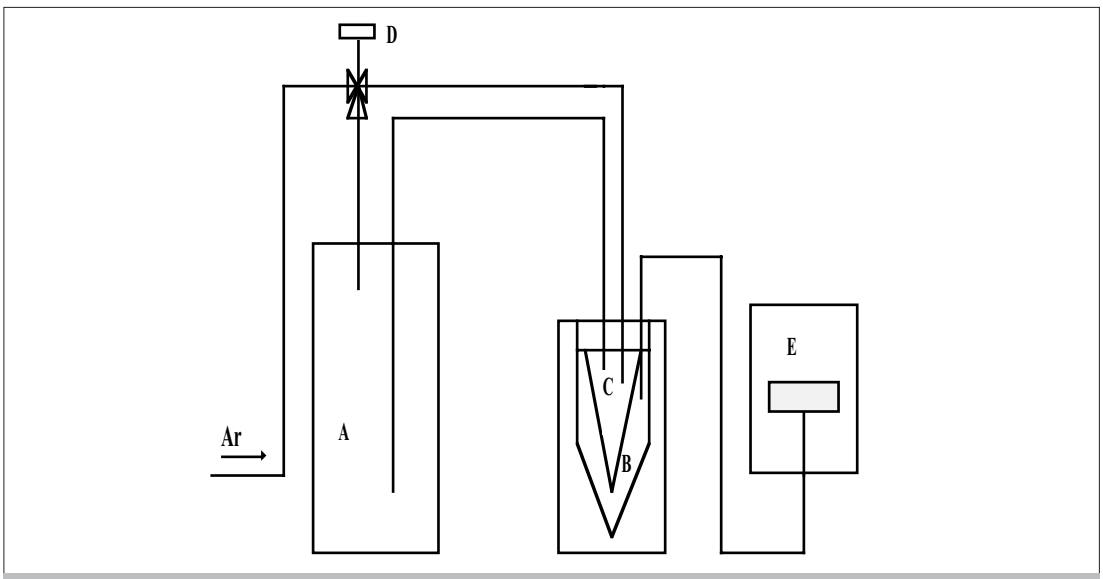


Figura 1: Esempio schematico del sistema batch. A: recipiente del riducente; B: contenitore di reazione; C: cono di immissione del riducente; D: valvola multivie; E: cella di misura.

Tabella 2: Condizioni operative tipiche per l'analisi del mercurio con il sistema "batch"

Purge 1	5 sec	
Reazione (riduzione con $NaBH_4$)	15 sec	lettura attivata
Purge 2	40 sec	
temp. cella	200 °C	

La fase "purge 1" ha lo scopo di eliminare dal campione composti volatili che possono interferire nella misura; per assicurare una eliminazione completa si può aumentare opportunamente la durata del "purge 1".
Durante la fase di reazione con $NaBH_4$ il mercurio (II) viene ridotto a mercurio metallico che viene trasferito mediante un flusso di gas inerte (Ar) nella cella di misura.
La fase "purge 2" consente la pulizia del sistema e la sua preparazione alla lettura del successivo campione.

7.1.2 Ottimizzazione dei parametri strumentali con il sistema "flow injection"

Per migliorare le prestazioni analitiche dell'apparecchiatura e per minimizzare eventuali interferenze procedere all'ottimizzazione dei parametri strumentali, seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento. In Tabb. 1a–2a sono elencate, a titolo di esempio, le condizioni operative tipiche per l'esecuzione delle analisi con il sistema "flow injection" (Fig. 2).

Tabella 1a: Condizioni operative strumentali per il sistema "flow injection"

Lunghezza d'onda (nm)	253,7
Fenditura (nm)	0,7
Rilevazione del segnale	altezza o area del picco
Correzione del fondo	attivata
Intensità di corrente della lampada (mA)	come da specifica
Volume di campionamento (µL)	500
Temperatura cella (°C)	200
Flusso di argon (mL/min)	90
Flusso "carrier" (HCl) (mL/min)	10
Flusso riducente ($NaBH_4$) (mL/min)	6

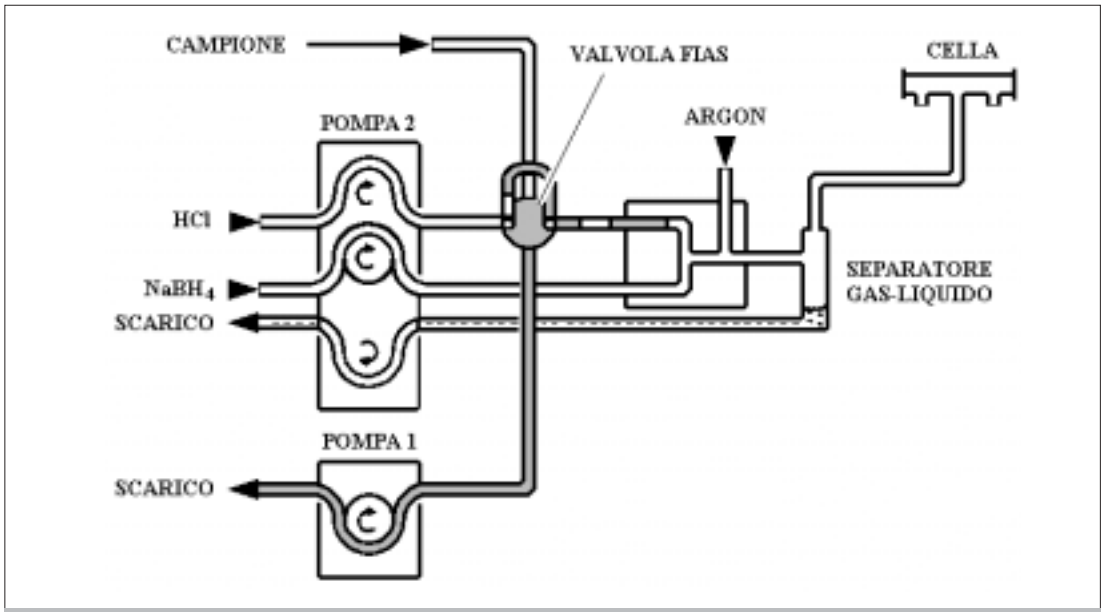


Figura 2: Esempio schematico del "Flow Iniection Analysis System" (FIAS).

Tabella 2a: Condizioni operative tipiche per l'analisi del mercurio con il sistema "flow injection"

Stadio	T(s)	P1 (rpm)	P2 (rpm)	Posizione valvola	lettura
0	15	sì	sì	riempimento	
1	10	sì	sì	riempimento	
2	1	no	sì	iniezione	sì

t(s) = tempo in secondi; P1, P2 = pompa 1, pompa 2; rpm = giri/min

La procedura di analisi con il sistema "flow injection" è condotta utilizzando la soluzione riducente (6.4) e la soluzione di trasporto costituita da HCl al 3% (p/v).

7.2 Analisi

7.2.1 Determinazione diretta

Dopo aver impostato i parametri strumentali, come descritto in (7.1.1) o (7.1.2) (nel caso che si adoperi, rispettivamente, il sistema "batch" o il "flow injection") costruire la curva di taratura utilizzando almeno tre soluzioni di riferimento scelte nel campo di indagine analitico, preparate diluendo opportunamente la soluzione (6.5), e il bianco dei reattivi. Ripetere la misura di ogni soluzione di riferimento compreso il bianco almeno tre volte.
Quindi, eseguire l'analisi dei campioni provenienti dal trattamento di mineralizzazione effettuando almeno tre letture per ogni soluzione da analizzare; si considerano accettabili i valori che forniscono un coefficiente di variazione inferiore al 10%. Le analisi dei campioni, delle soluzioni di riferimento e del bianco dei reattivi devono essere effettuate nelle stesse condizioni strumentali. Se la risposta del campione incognito analizzato cade al di fuori dell'intervallo di linearità, diluire opportunamente il campione per riportarlo nel campo di linearità. Nel caso in cui sia richiesta l'analisi di un numero notevole di campioni si consiglia di controllare la taratura inserendo ogni cinque campioni una soluzione di controllo utilizzata per la taratura e verificando che il valore di quest'ultima risulti entro il ±5% del valore atteso.

7.2.2 Metodo delle aggiunte note

Il campione proveniente dal trattamento di mineralizzazione viene suddiviso in quattro aliquote, di cui una rimane tal quale, mentre alle altre si aggiungono concentrazioni crescenti dell'analita dello stesso ordine di grandezza di quella attesa per il campione. Misurare l'assorbanza delle quattro soluzioni e del bianco dei reattivi, seguendo le indicazioni riportate in 7.2.1 avendo cura di ripetere le misure almeno tre volte. La concentrazione totale del mercurio presente nelle aliquote non deve superare il valore limite oltre il quale la risposta strumentale non è più lineare.

8. Calcoli

8.1 Determinazione diretta

La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le concentrazioni (μg/L) delle soluzioni di riferimento in ascissa e le assorbanze corrispondenti, corrette del bianco, in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%. Calcolare quindi la concentrazione di mercurio nel campione utilizzando l'equazione ottenuta dalla regressione lineare, tenendo conto dell'eventuale diluizione effettuata.

8.2 Metodo delle aggiunte

Siano C_1, C_2, C_3, rispettivamente le concentrazioni corrispondenti alla 1ª, 2ª, 3ª aggiunta e A_0, A_1, A_2, A_3, le assorbanze del campione (A_0) e del campione addizionato delle varie aggiunte, sottratte del bianco dei reattivi. Calcolare la retta di regressione che interpola i valori di assorbanza in funzione delle concentrazioni aggiunte, attribuendo al campione incognito di assorbanza A_0 una concentrazione "aggiunta" uguale a zero. La concentrazione incognita riferita al campione sarà data dal valore dell'intercetta sull'asse (x) cambiato di segno. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%.

9. Qualità del dato

Prove effettuate (n=5) da due laboratori, uno che ha utilizzato la procedura "batch" e l'altro

la procedura "flow injection", su soluzioni sintetiche di acqua deionizzata contenenti 0,5-5 µg/L di mercurio inorganico, hanno fornito valori del coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100, entro il 5%.
Va tenuto presente che la precisione di un metodo generalmente peggiora all'aumentare della complessità della matrice.

Nota: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiale di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".*
Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

METODO A3 – Ossidazione in forno a microonde e determinazione per spettrometria di assorbimento atomico a vapori freddi (CV-AAS) e amalgama su oro

1. Principio del metodo

Il mercurio viene determinato mediante spettrometria di assorbimento atomico a vapori freddi (CV-AAS) alla lunghezza d'onda di 253,7 nm utilizzando due possibili configurazioni strumentali: sistema "batch" oppure "flow injection". Il metodo si avvale di una ossidazione chimica in forno a microonde in cui avviene la decomposizione della sostanza organica e dei composti organomercurici e la trasformazione di tutto il mercurio presente a mercurio (II). Successivamente il mercurio (II), ridotto dal sodio boroidruro a mercurio elementare, viene vaporizzato in un sistema a circolazione chiusa e quindi trasferito mediante un gas inerte dapprima su una retina di oro (amalgama) e, successivamente, nella cella di misura.

2. Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione del mercurio totale in campioni di acque di scarico e naturali (dolci e di mare) nell'intervallo di concentrazione da 0,01 a 0,50 µg/L. Concentrazioni superiori a 0,50 µg/L possono essere determinate direttamente senza utilizzo dell'amalgama (vedi metodo A2).
Effettuando 10 determinazioni su uno stesso campione avente un contenuto di mercurio pari a 10 ng/L, alternate con una misura del bianco, si è potuto calcolare un limite di rivelabilità, espresso come tre volte lo scarto tipo, di 2 ng/L.

3. Interferenze e cause di errore

Vale quanto riportato al Capitolo 3 del metodo A2.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". In particolare considerando le basse concentrazioni di mercurio da analizzare, il campionamento e la conservazione dei campioni possono rappresentare se effettuati erroneamente, una importante sorgente di

contaminazione. Per ridurre drasticamente questo rischio effettuare il prelievo con recipienti (polipropilene o policarbonato o altro materiale caratterizzato da una irrilevante capacità di cessione e adsorbimento di metalli) preventivamente trattati con HNO_3 1 M per 48 ore e quindi neutralizzati effettuando lavaggi con acqua ad elevato grado di purezza.
I campioni debbono essere stabilizzati aggiungendo, subito dopo il prelievo, 1 mL di HNO_3 concentrato di grado ultrapuro per ogni 100 mL di campione. L'analisi deve essere effettuata prima possibile e, comunque, entro una settimana. Qualora si voglia determinare il solo mercurio disciolto, il campione deve essere filtrato sotto pressione con corrente d'azoto di grado ultrapuro attraverso un filtro a membrana in policarbonato da 0,45 µm (precedentemente condizionato secondo la procedura descritta per i contenitori), prima di effettuare l'aggiunta di HNO_3. Per una lunga conservazione del campione si consiglia di acidificare come descritto in precedenza e quindi congelare.
È buona norma considerare sempre l'opportunità di predisporre un "bianco di campo", ottenuto semplicemente mediante lo stoccaggio di un'aliquota di acqua ultrapura in un recipiente identico a quello dei prelievi, da sottoporre successivamente a tutte le fasi analitiche previste per i campioni. Altri sistemi di controllo della qualità del campionamento consistono nell'uso di campioni replicati, nell'attivazione di precauzioni per proteggere i campioni in modo da evitare qualsiasi possibile contaminazione, nell'avvinamento regolare dei recipienti.

5. Apparecchiature

5.1 Spettrofotometro di assorbimento atomico, che consenta il montaggio del sistema "batch" e del sistema "flow injection" corredato di dispositivo per la correzione degli assorbimenti aspecifici, del dispositivo per l'arricchimento del mercurio mediante amalgama su oro e di un sistema di intrappolamento dei vapori (vedi Appendice).

Per le altre apparecchiature vale quanto riportato al Capitolo 5, dal Paragrafo 5.2 al Paragrafo 5.7 del metodo A2.

6. Reattivi

Tutti i reattivi e l'acqua utilizzata per i lavaggi e la preparazione delle soluzioni di riferimento devono essere ad elevato grado di purezza.

6.1 Acido nitrico concentrato (d=1,40) di grado ultrapuro.

6.2 Acido cloridrico concentrato (d=1,19) di grado ultrapuro.

6.3 Soluzione di $NaBH_4$ al 3% in NaOH all'1% per sistema "batch".

Vale quanto riportato al Paragrafo 6.3 del metodo A2.

6.4 Soluzione di $NaBH_4$ (0,2%) in NaOH (0,05%) per sistema "flow injection".

Vale quanto riportato al Paragrafo 6.4 del metodo A2.

Nota: *il sodio boroidruro libera idrogeno a contatto con acido, dovrà pertanto essere maneggiato con cura e conservato secondo le indicazioni del fornitore.*

6.5 Soluzione concentrata di mercurio (1 mg/mL)

Vale quanto riportato al Paragrafo 6.5 del metodo A2.

7. Procedimento

7.1 Mineralizzazione con microonde in presenza di acido nitrico

Vale quanto riportato al Paragrafo 7.1 del metodo A2.

7.1.1 Ottimizzazione dei parametri strumentali per sistema "batch"

Per migliorare le prestazioni analitiche dell'apparecchiatura e per minimizzare eventuali interferenze procedere all'ottimizzazione dei parametri strumentali, seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento. In Tabb. 3-4 sono elencate, a titolo di esempio, le condizioni operative tipiche per l'esecuzione delle analisi con il sistema "batch" (Fig. 1 metodo A2).

Tabella 3: Condizioni operative strumentali per il sistema "batch"

Lunghezza d'onda (nm)	253,7
Fenditura (nm)	0,7
Rilevazione del segnale	altezza o area del picco
Correzione del fondo	attivata
Intensità di corrente della lampada (mA)	come da specifica
Volume del campione (mL)	10
Volume di $NaBH_4$ (mL)	4

Tabella 4: Condizioni operative tipiche per l'analisi del mercurio con il sistema "batch"

Purge 1	40 sec	
Reazione (riduzione con $NaBH_4$)	10 sec	lettura attivata
Purge 2	30 sec	
temp. cella	200 °C	

Durante la fase di reazione con $NaBH_4$ il mercurio (II) viene ridotto a mercurio metallico e trasferito mediante un flusso di gas inerte (Ar) su una retina di oro sulla quale il mercurio si amalgama consentendo, attraverso successivi arricchimenti, di aumentare la sensibilità strumentale. Effettuare quindi il riscaldamento (T=200°C) della retina di oro; in questa fase l'apertura di una valvola consente il passaggio di un flusso di argon (purificato a seguito del passaggio attraverso una maglia di oro) che trasferisce il mercurio atomico nella cella di misura.

7.1.2 Ottimizzazione dei parametri strumentali con il sistema "flow injection"

Per migliorare le prestazioni analitiche dell'apparecchiatura e per minimizzare eventuali interferenze procedere all'ottimizzazione dei parametri strumentali, seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento. In Tabb. 3a–4a sono elencate, a titolo di esempio, le condizioni operative tipiche per l'esecuzione delle analisi con il sistema "flow injection" (Fig. 2 metodo A2).

Tabella 3a: Condizioni operative strumentali per il sistema "flow injection"	
Lunghezza d'onda (nm)	253,7
Fenditura (nm	0,7
Rilevazione del segnale	altezza o area del picco
Correzione del fondo	attivata
Intensità di corrente della lampada (mA)	come da specifica
Volume di campionamento (µL)	1000
Temperatura cella (°C)	200
Flusso di argon (mL/min)	90
Flusso "carrier" (HCl) (mL/min)	10
Flusso riducente ($NaBH_4$) (mL/min)	6

Tabella 4a: Condizioni operative tipiche per l'analisi del mercurio con il sistema "flow injection"

Stadio	t (s)	P1 (rpm)	P2 (rpm)	Posizione valvola	lettura
pre-fill	15	sì	sì	riempimento	
1	10	sì	sì	riempimento	
2	20	no	sì	iniezione	
3	20	no	sì	iniezione	sì

t(s) = tempo in secondi; P1, P2 = pompa 1, pompa 2; rpm = giri/min

La procedura di analisi con il sistema FIAS è condotta utilizzando la soluzione riducente (6.4) e la soluzione di trasporto costituita da HCl al 3% (p/v).
Al fine di ottenere una idonea risposta strumentale l'operatore dovrà realizzare un opportuno arricchimento del mercurio sull'amalgama mediante ripetizione degli stadi 1 e 2. Passare quindi allo stadio n. 3, effettuando il riscaldamento (T=200°C) della retina di oro contenuta nell'amalgama; in questa fase l'apertura di una valvola consente il passaggio di un flusso di argon che trasferisce il mercurio atomico nella cella di misura.

7.2 Analisi

7.2.1 Determinazione diretta

Vale quanto riportato al Sottoparagrafo 7.2.1 del metodo A2.

7.2.2 Metodo delle aggiunte note

Vale quanto riportato al Sottoparagrafo 7.2.2 del metodo A2.

8. Calcoli

8.1 Determinazione diretta

Vale quanto riportato al Paragrafo 8.1 del metodo A2. Tener conto del fattore di arricchimento, vale a dire il volume di campione concentrato sull'amalgama.

8.2 Metodo delle aggiunte

Vale quanto riportato al Paragrafo 8.2 del metodo A2. Tener conto del fattore di arricchimento, vale a dire il volume di campione concentrato sull'amalgama.

9. Qualità del dato

Prove effettuate (n=5) da due laboratori, uno che ha utilizzato la procedura "batch" con amalgama e l'altro la procedura "flow injection" con amalgama, su soluzioni sintetiche di acqua deionizzata contenenti 0,05-1 µg/L di mercurio inorganico, hanno fornito valori del coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100, entro il 5%. Va tenuto presente che la precisione di un metodo generalmente peggiora all'aumentare della complessità della matrice.
Nelle misure condotte con il sistema in "batch" sono stati effettuati tre arricchimenti da 10 mL ciascuno, mentre con il "flow injection" sono stati concentrati sull'amalgama 30 mL di campione.

APPENDICE

Raccomandazioni sull'uso in sicurezza di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico a vapori freddi

I vapori di mercurio metallico prodotti a seguito della reazione con sodio boroidruro sono altamente tossici e rappresentano, se inalati, un serio pericolo per l'operatore. Si consiglia pertanto di procedere ad un intrappolamento di tali vapori. Ciò si realizza attraverso un sistema a circolazione chiusa come quello riportato in Fig. 3. I vapori di mercurio elementare vengono trasportati mediante un flusso di gas inerte (Ar) attraverso il tubo (d) nella cella di misura (A), chiusa all'estremità da finestre (f) costituite di materiale trasparente a 253,7 nm. Successivamente vengono convogliati tramite i tubi di collegamento (e) prima in una trappola di essiccazione (B) e poi in una trappola (C) contenente un filtro a carbone attivo che trattiene il mercurio. L'uscita della trappola a carbone attivo (g) è collegata, tramite un tubo, ad una cappa aspirante provvista anch'essa di filtro a carbone attivo. Il carbone attivo deve essere sostituito periodicamente e sottoposto a smaltimento nel rispetto delle normative vigenti.

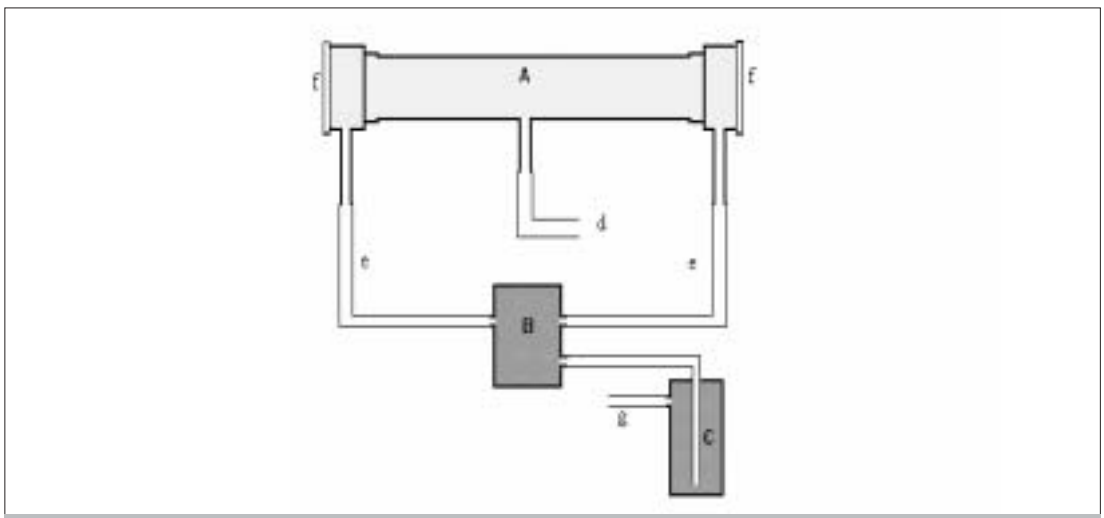


Figura 3: Descrizione schematica del sistema a circolazione chiusa utilizzato per intrappolare i vapori di mercurio.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA), 3-22/3-24.

COSSA S. & NOEL J. (1987): "Concentration of mercury in near shore surface waters of the Bay of Biscay and in the Gironde estuary", *Mar. Chem.*, **20**, 389-396.

FERRARA R., SERITTI A., BARGHIGIANI C. & PETROSINO A. (1986): "Mercury levels in the dissolved and particulate fractions of the Thyrrhenian sea", *Mar. Chem.*, **18**, 227-232.

FERRARA R., SERITTI A., BARGHIGIANI C. & PETROSINO A. (1980): "Improved instrument for mercury determination by atomic fluorescence spectrometry with a high-frequency electrodeless discharge lamp", *Analyt. Chim. Acta*, **117**, 391-395.

IRSA (1986 a): "I metalli nelle acque: origine, distribuzione, metodi di rimozione", Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **71**, 17-20.

IRSA (1986 b): "Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **75**, 244-252.

ISO (1983): "*Determination of total mercury by flameless atomic absorption spectrometry - Part 1: Method after digestion with permanganate-peroxodisulfate*", 5666/1, 16-21.

MOORE J.W. & RAMAMOORTHY S. (1983): *"Heavy metals in natural waters-Applied monitoring and impact assessment"*, De Santo Ed., Springer-Verlag, New York.

PAGANO S.T., SMITH B.W. & WINEFORDNER J.D. (1994): "Determination of mercury in microwave-digested soil by laser-excited atomic fluorescence spectrometry with electrothermal atomization", *Talanta*, **41**, 2073-2078.

APAT
Agenzia per la protezione
dell'ambiente e per i servizi tecnici

IRSA-CNR
Istituto di Ricerca sulle Acque
Consiglio Nazionale delle Ricerche

Metodi analitici per le acque

Volume Secondo

Sezione 4000 - Inorganici non metallici

Sezione 5000 - Organici

APAT
Manuali e Linee Guida 29/2003

Informazioni legali
L'Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici (**APAT**) o le persone che agiscono per suo conto non sono responsabili dell'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questo manuale.

APAT - Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici
Via Vitaliano Brancati, 48 - 00144 Roma
www.apat.it

CNR-IRSA - Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto di Ricerca sulle Acque
Via Reno, 1 - 00198 Roma
www.irsa.rm.cnr.it

© APAT, Rapporti 29/2003

ISBN 88-448-0083-7

Riproduzione autorizzata citando la fonte

Elaborazione grafica
APAT

Grafica di copertina: Franco Iozzoli

Foto: Paolo Orlandi

Coordinamento tipografico
APAT

Impaginazione e stampa
I.G.E.R. srl - Viale C.T. Odescalchi, 67/A - 00147 Roma

Stampato su carta TCF

Finito di stampare febbraio 2004

Il manuale "Metodi Analitici per le Acque" è pubblicato nella serie editoriale "Manuali e Linee Guida" dell'Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per i Servizi Tecnici (APAT).

L'opera si articola in tre volumi, suddivisi in sezioni (da 1000 a 9040). Fatta eccezione per la parte generale (sezioni 1000-1040), ogni sezione contiene uno o più metodi, costituiti da capitoli, paragrafi e sottoparagrafi.

I metodi analitici riportati nel manuale sono stati elaborati da una Commissione istituita nel 1996 dall'Istituto di Ricerca sulle Acque del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IRSA-CNR), per l'aggiornamento e l'ampliamento dei metodi riportati nel Quaderno 100 "Metodi analitici per le acque", pubblicato dall'IRSA-CNR ed edito dal Poligrafico dello Stato nel 1994.

Un Gruppo di Lavoro, coordinato dall'APAT, e formato dal Servizio di Metrologia Ambientale dell'APAT, dall'Istituto di Ricerca sulle Acque del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IRSA-CNR), dalle Agenzie Regionali per la Protezione dell'Ambiente (ARPA) e dalle Agenzie Provinciali per la Protezione dell'Ambiente (APPA), con il contributo del Centro Tematico Nazionale "Acque interne e marino costiere" (CTN/AIM), ha provveduto ad una revisione critica e ad una integrazione dei metodi analitici prodotti dalla Commissione istituita dall'IRSA-CNR.

I metodi analitici riportati nel presente manuale possono essere riprodotti ed utilizzati purché ne sia citata la fonte.

L'edizione finale è a cura di:
Maria Belli, Damiano Centioli, Paolo de Zorzi, Umberto Sansone
(Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici - APAT)
Silvio Capri, Romano Pagnotta, Maurizio Pettine
(Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto di Ricerca sulle Acque - CNR-IRSA)

Indice

VOLUME 1

PRESENTAZIONE

PREMESSA

1000 - PARTE GENERALE
1010 - Strutture, attrezzature e reattivi di laboratorio 5
1020 - Lineamenti di tecniche analitiche 25
1030 - Metodi di campionamento 75
1040 - Qualità del dato analitico 87

2000 PARAMETRI FISICI, CHIMICI E CHIMICO-FISICI
2010 - Acidità e alcalinità (Acidità: titrimetrico; Alcalinità: potenziometrico e titrimetrico) 115
2020 - Colore (qualitativo; spettrofotometrico; metodo al platino-cobalto) 123
2030 - Conducibilità 131
2040 - Durezza (per calcolo; complessometrico con EDTA) 137
2050 - Odore 141
2060 - pH 145
2070 - Salinità 153
2080 - Sapore 157
2090 - Solidi (totali disciolti; totali sospesi; sedimentabili; fissi e volatili a 600°C) 161
2100 - Temperatura 171
2110 - Torbidità 177
2120 - Trasparenza 183

3000 - METALLI E SPECIE METALLICHE
3010 - Trattamento preliminare dei campioni per l'analisi dei metalli mediante mineralizzazione acida 189
3020 - Determinazione di elementi chimici mediante spettroscopia di emissione con sorgente al plasma (ICP-OES) 197
3030 - Determinazione di cationi (sodio, ammonio, potassio, magnesio, calcio) mediante cromatografia ionica 215
3040 - Metodi di preconcentrazione per la determinazione di metalli in tracce 225
3050 - Alluminio (F-AAS; ETA-AAS; spettrofotometrico con eriocromocianina R) 237
3060 - Antimonio (ETA-AAS; HG-AAS) 251
3070 - Argento (ETA-AAS; APDC+ETA-AAS) 263
3080 - Arsenico (HG-AAS; spettrofotometrico con dietilditiocarbammato di argento) 271
3090 - Bario (F-AAS; ETA-AAS) 283
3100 - Berillio (ETA-AAS) 291
3110 - Boro (spettrofotometrico con curcumina; spettrofotometrico con carminio) 297
3120 - Cadmio (F-AAS; ETA-AAS) 303
3130 - Calcio (F-AAS) 311
3140 - Cobalto (ETA-AAS) 315

3150 - Cromo (Cromo totale: F-AAS; ETA-AAS; Cromo VI: APDC+ETA-AAS; Cromo III: ETA-AAS dopo eliminazione di Cromo VI; Cromo totale: coprecipitazione con Fe $(OH)_3$+ETA-AAS; Cromo VI: spettrofotometrico con difenilcarbazide) 321
3160 - Ferro (F-AAS; ETA-AAS) 345
3170 - Litio (F-AAS) 355
3180 - Magnesio (F-AAS) 359
3190 - Manganese (F-AAS; ETA-AAS) 363
3200 - Mercurio (ossidazione con $KMnO_4$+CV-AAS; ossidazione con HNO_3 mediante microonde +CV-AAS; ossidazione con HNO_3 mediante microonde +CV-AAS e amalgama su oro) 373
3210 - Molibdeno (ETA-AAS) 391
3220 - Nichel (F-AAS; ETA-AAS) 397
3230 - Piombo (F-AAS; ETA-AAS; spettrofotometrico con ditizone) 405
3240 - Potassio (F-AAS) 419
3250 - Rame (F-AAS; ETA-AAS; spettrofotometrico con ossalildiidrazide) 423
3260 - Selenio (HG-AAS; spettrofotometrico con o-fenilendiammina) 435
3270 - Sodio (F-AAS) 445
3280 - Stagno (F-AAS; ETA-AAS; spettrofotometrico con violetto di catechina) 449
3290 - Tallio (ETA-AAS; APDC+ETA-AAS) 461
3300 - Tellurio (ETA-AAS) 471
3310 - Vanadio (ETA-AAS; coprecipitazione con $Fe(OH)_3$+ETA-AAS) 477
3320 - Zinco (F-AAS) 487

VOLUME 2

4000 - COSTITUENTI INORGANICI NON METALLICI
4010 - Anidride carbonica 495
4020 - Anioni (fluoruro, cloruro, nitrito, bromuro, nitrato, fosfato e solfato) in cromatografia ionica 499
4030 - Azoto ammoniacale (spettrofotometrico all'indofenolo; spettrofotometrico con reattivo di Nessler; potenziometrico; spettrofotometrico o titrimetrico, previa distillazione) 509
4040 - Azoto nitrico (spettrofotometrico mediante salicilato di sodio; spettrofotometrico con NEDA) 525
4050 - Azoto nitroso 533
4060 - Azoto totale e fosforo totale 537
4070 - Cianuro 541
4080 - Cloro attivo libero 547
4090 - Cloruro (titolazione argentometrica, mercurimetrica e potenziometrica) 553
4100 - Fluoruro (spettrofotometrico; potenziometrico) 565
4110 - Fosforo (ortofosfato; fosforo totale) 575
4120 - Ossigeno disciolto (titolazione iodometrica; titolazione potenziometrica) 583
4130 - Silice 595
4140 - Solfato (gravimetrico; torbidimetrico) 599
4150 - Solfito (titolazione iodometrica; metodo cromatografico) 605
4160 - Solfuro 613

5000 - COSTITUENTI ORGANICI
5010 - Aldeidi (composti carbonilici) (spettrofotometrico con MBTH; derivatizzazione + SPE+HPLC-UV; derivatizzazione + LLE+GC-ECD) 621
5020 - Ammine alifatiche (GC-AFD) 635
5030 - Azoto organico 641
5040 - Carbonio organico disciolto 645

5050 - Diserbanti ureici (LLE o SPE+HPLC-UV) 653
5060 - Prodotti fitosanitari (antiparassitari, pesticidi) (LLE o SPE+GC-NPD o HPLC-UV o GC-MS) 661
5070 - Fenoli (spettrofotometrico con 4-amminoantipirina previa estrazione; spettrofotometrico diretto con 4-amminoantipirina; LLE o SPE+HPLC-UV) 679
5080 - Idrocarburi policiclici aromatici (LLE o SPE+GC-MS; LLE o SPE+HPLC-UV o HPLC-fluorescenza) 697
5090 - Pesticidi clorurati (LLE+GC-ECD) 707
5100 - Pesticidi fosforati (LLE+GC-FPD) 723
5110 - Policlorobifenili e policloroterfenili (LLE+GC-MS o GC-ECD) 743
5120 - Richiesta biochimica di ossigeno (BOD_5) 767
5130 - Richiesta chimica di ossigeno (COD) 781
5140 - Solventi organici aromatici (spazio di testa statico +GC-FID; spazio di testa dinamico+GC-FID) 789
5150 - Solventi clorurati (spazio di testa statico+GC-ECD; spazio di testa dinamico+GC-ECD) 799
5160 - Sostanze oleose (grassi e oli animali e vegetali; idrocarburi totali) (gravimetrico; IR) 811
5170 - Tensioattivi anionici (MBAS) 827
5180 - Tensioattivi non ionici (BIAS) 833

VOLUME 3

6000 - METODI MICROBIOLOGICI - PARTE GENERALE
6010 - Modalità di campionamento 845
6020 - Lineamenti di tecniche analitiche 849
6030 - Generalità sui terreni di coltura per batteriologia 853
6040 - Attrezzature di base per le analisi microbiologiche delle acque 855

7000 - METODI PER LA DETERMINAZIONE DI MICROORGANISMI INDICATORI DI INQUINAMENTO E DI PATOGENI
7010 - Coliformi totali 865
7020 - Coliformi fecali 875
7030 - *Escherichia coli* 883
7040 - Streptococchi fecali ed enterococchi 895
7050 - Conteggio delle colonie su agar a 36°C e 22°C 909
7060 - Spore di clostridi solfito riduttori 913
7070 - *Aeromonas spp* 921
7080 - *Salmonella spp* 927
7090 - *Vibrio spp* 935
7100 - Uova di elminti 941
7110 - Batteriofagi 945
7120 - Enterovirus 959
7130 - Oocisti di *Cryptosporidium* e cisti di *Giardia* 971

8000 - METODI ECOTOSSICOLOGICI
8010 - Metodi di valutazione della tossicità con pesci 985
8020 - Metodi di valutazione della tossicità con *Daphnia* 993
8030 - Metodo di valutazione della tossicità acuta con batteri bioluminescenti 1003
8040 - Metodo di valutazione della tossicità acuta con *Ceriodaphnia dubia* 1013
8050 - Metodo di valutazione della tossicità acuta con *Mysidopsis bahia* 1027
8060 - Metodo di valutazione della tossicità acuta con *Artemia sp.* 1043

8070 - Metodo di valutazione della tossicità acuta con *Cyprinodon variegatus* 1051
8080 - Metodo di valutazione della tossicità acuta con trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) 1065
8090 - Metodo di valutazione della tossicità cronica (7 giorni) con *Mysidopsis bahia* 1075
8100 - Metodo di valutazione della tossicità cronica (7 giorni) con *Ceriodaphnia dubia* 1085
8110 - Metodo di valutazione della tossicità cronica (7 giorni) con *Cyprinodon variegatus* 1091
8120 - Saggio di tossicità prolungato (14-28 giorni) con trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) (metodo preliminare) 1099
8130 - Analisi statistica dei risultati di saggi cronici 1109

9000 - INDICATORI BIOLOGICI
9010 - Indice biotico esteso (I.B.E.) 1115
9020 Determinazione della clorofilla: metodo spettrofotometrico 1137
9030 Determinazione dell'adenosintrifosfato (ATP) 1143
9040 Conta diretta dell'abbondanza microbica (DAPI) 1149

4000 - COSTITUENTI INORGANICI NON METALLICI

In questa parte del Manuale sono descritti i metodi per la determinazione di costituenti inorganici non metallici.
Le procedure indicate sono utilizzabili per indagini sulla qualità dei corpi idrici e per il loro controllo, per il trattamento e la fornitura di acqua potabile e per la verifica di operazioni e processi di trattamento di acque di scarico.
I metodi prevedono l'impiego delle seguenti tecniche:

- spettrofotometria di assorbimento molecolare nella regione del visibile;
- potenziometria;
- volumetria;
- gravimetria;
- turbidimetria;
- cromatografia ionica.

Le tecniche sopra menzionate sono ampiamente descritte nella parte generale (Sezione 1020), dove sono anche descritti i metodi di campionamento e di conservazione del campione (Sezione 1030).

4010. Anidride carbonica (Biossido di carbonio)

Con questo metodo si determina l'anidride carbonica (biossido di carbonio) disciolta nell'acqua come tale (anidride carbonica libera); quest'ultima si distingue dall'anidride carbonica combinata che è ritrovata sotto forma di ione bicarbonato o carbonato.
Come risulta dalla Fig. 1 nell'intervallo di pH tra 4,5 e 8 coesistono lo ione bicarbonato e l'anidride carbonica libera. La CO_2 libera può essere determinata per titolazione diretta alla fenolftaleina con carbonato di sodio.

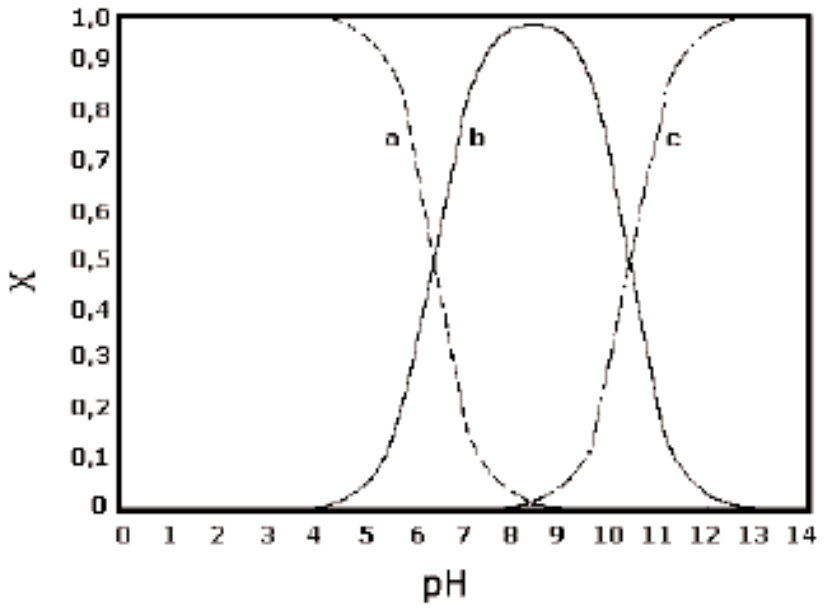


Figura 1: Curva delle frazioni molari (X) del carbonio inorganico totale presenti nelle diverse forme in funzione del pH della soluzione a 25°C. a: acido carbonico; b: bicarbonati; c: carbonati.

Quando sia richiesta infine una particolare accuratezza nella determinazione della CO_2 libera, è necessario ricorrere alla procedura descritta nel metodo "Carbonio Inorganico Totale" (vedi metodo 5040 "Carbonio organico disciolto"), che consente di determinare il contenuto totale di CO_2 libera e combinata.
Il contenuto di CO_2 combinata può essere determinato a parte secondo quanto descritto nel metodo 2010 "Acidità ed alcalinità". La CO_2 libera si ottiene per differenza.
Se l'acqua in esame ha un pH inferiore a 4,5 si è in presenza anche di acidità minerale (vedi metodo 2010 "Acidità ed alcalinità").

1. Principio del metodo

L'anidride carbonica libera reagisce col carbonato di sodio per formare bicarbonato. Il punto di equivalenza viene rilevato per via potenziometrica o dall'apparire della colorazione rosa caratteristica dell'indicatore alla fenolftaleina a pH 8,3.

2. Campo di applicazione

Il metodo può essere impiegato in acque naturali o industriali a partire da concentrazioni di 0,2 mg/L.

3. Interferenze e cause di errore

Cationi ed anioni che alterino in misura notevole l'equilibrio tra anidride carbonica e ione bicarbonato inficiano il risultato della determinazione. Ioni metallici come alluminio, cromo, rame e ferro, che precipitano in ambiente basico producono risultati in eccesso. La concentrazione dello ione ferroso non dovrebbe superare 1 mg/L. Errori in eccesso vengono causati anche da basi deboli (ammine e ammoniaca) e da sali di acidi deboli e basi forti (borati, nitriti, fosfati, silicati e solfuri). Tali sostanze dovrebbero essere assenti. Qualora il pH sia inferiore a 4,5, come nel caso di scarichi contenenti acidi minerali, o di effluenti da scambiatori cationici rigenerati con acido, questo metodo è inapplicabile e si deve ricorrere alla neutralizzazione con un eccesso di basi forti, ad esempio $Ba(OH)_2$ 0,1 N e retrotitolazione con HCl 0,1 N. Errori in difetto possono venire causati da un alto contenuto in solidi totali disciolti, come nel caso di acque marine, o da una eccessiva aggiunta di indicatore.

4. Campionamento e conservazione del campione

Anche usando un'accurata tecnica di prelievo, ci si deve aspettare qualche perdita di CO_2 disciolta durante la conservazione o la manipolazione del campione, specie se questo gas è presente ad elevata concentrazione; talvolta invece il contenuto in CO_2 di un campione può aumentare durante la conservazione. È quindi consigliabile eseguire la determinazione sul campo, il più presto possibile. Qualora ciò non fosse possibile, raccogliere e conservare il campione in bottiglie da 500 mL riempite in modo da non lasciare spazio d'aria tra il livello del liquido e il tappo, mantenendolo ad una temperatura inferiore a quella che aveva al momento del prelievo. Effettuare la determinazione in laboratorio il più presto possibile.

5. Apparecchiature

5.1 Normale vetreria di laboratorio

5.2 Buretta per titolazione con divisioni da 0,05 mL

5.3 pHmetro, corredato di elettrodo di misura e di riferimento.

6. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e le soluzioni preparate con acqua deionizzata ad elevato grado di purezza. L'acqua va conservata in un recipiente protetto dal contatto con l'aria esterna per mezzo di trappole a calce sodata.

6.1 Soluzione di indicatore alla fenolftaleina

Sciogliere 0,5 g di sale disodico di fenolftaleina in 100 mL di acqua. Se necessario aggiungere poche gocce di soluzione di NaOH 0,02 N fino a leggera colorazione rosa.

6.2 Soluzione di riferimento di carbonato di sodio 0,0454 N

Sciogliere 2,407 g di Na_2CO_3 anidro, precedentemente essiccato in stufa a 110°C, in un litro d'acqua.

7. Procedimento

Travasare da 100 a 250 mL di campione in un cilindro graduato per mezzo di un sifone che peschi da un lato nella bottiglia di prelievo e dall'altro abbia l'estremità il più vicino possibile al fondo del cilindro. Far traboccare il campione dalla sommità del recipiente e rimuovere rapidamente l'eccesso.
Aggiungere 5 gocce di fenolftaleina (6.1). Se il campione si colora di rosso, l'anidride carbonica libera è assente. Se viceversa rimane incolore, titolare rapidamente con la soluzione di carbonato di sodio (6.2), agitando con una bacchetta, fino all'apparire di un colore rosa persistente per circa 30 secondi, osservando il campione dall'alto.
In presenza di campioni torbidi o colorati, ove si desideri una determinazione più precisa, è opportuno rilevare il punto finale della titolazione per via potenziometrica. A tal fine, utilizzare titolatori automatici in grado di registrare la curva pH/volume di titolante aggiunto. Individuare il punto finale della titolazione in corrispondenza del flesso di questa curva.
In presenza di un elevato contenuto di CO_2 libera, che rende più probabile il verificarsi di perdite di analita nell'aria, è opportuno effettuare una seconda titolazione rapida. Prelevare il campione nella maniera descritta in precedenza ed aggiungere rapidamente, in una sola porzione, un volume di soluzione di carbonato di sodio circa pari a quello impiegato per la prima titolazione. Aggiungere 5 gocce di fenolftaleina e, se il campione rimane incolore, aggiungere altra soluzione di carbonato di sodio fino a viraggio.

8. Calcoli

Il contenuto in CO_2 libera si ricava dalla formula:

$$CO_2(mg/L) = \frac{a \cdot N \cdot 22 \cdot 1000}{V}$$

dove:
a = volume (mL) di soluzione di Na_2CO_3 impiegato per la titolazione;
N = normalità della soluzione titolante;
V = volume (mL) di campione adoperato per la titolazione;
22 = peso equivalente di CO_2.

9. Qualità del dato

La precisione e accuratezza del metodo sono intorno al 10% della concentrazione di CO_2 libera.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA), 4-26/4-32.

4020. Determinazione di anioni (fluoruro, cloruro, nitrito, bromuro, nitrato, fosfato e solfato) mediante cromatografia ionica

1. Principio del metodo

Il metodo è basato sulla determinazione simultanea di specie anioniche mediante cromatografia ionica. Questa tecnica si basa sulla separazione degli analiti mediante colonna di scambio anionico in base alla loro affinità per la fase stazionaria. L'eluente, contenente gli analiti separati, passa poi attraverso un dispositivo di derivatizzazione chimica post-colonna detto soppressore che, scambiando protoni con la fase mobile, ha lo scopo di abbassare la conducibilità di fondo dell'eluente, per formazione dell'acido debole coniugato, e di esaltare il segnale dell'analita, che viene rivelato mediante un conduttimetro in linea.
Il riconoscimento degli analiti viene effettuato confrontando il tempo di ritenzione dei picchi del campione con il tempo di ritenzione di soluzioni di riferimento. La concentrazione viene determinata confrontando l'area del picco con la curva di taratura dell'analita costruita mediante una serie di soluzioni di riferimento a diverse concentrazioni.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile alle acque dolci naturali (superficiali, sotterranee, potabili, minerali e meteoriche), alle acque trattate e agli scarichi domestici ed industriali. Il campo di applicazione, utilizzando un volume di iniezione da 25 µL, è compreso tra 0,1 e 100 mg/L per cloruro, nitrato e solfato; tra 0,1 e 10 mg/L per bromuro e nitrito; tra 0,2-20 mg/L per fluoruro e fosfato.
Campioni che presentano concentrazioni più elevate possono essere analizzati dopo un'opportuna diluizione. Campioni aventi concentrazione inferiore al limite di applicabilità possono essere analizzati aumentando il volume di iniezione fino a 200 µL.

3. Interferenze e cause di errore

Sostanze con tempi di ritenzione simili a quelli degli analiti di interesse possono interferire con la determinazione, specie se presenti in elevate quantità. Questo tipo di interferenza, facilmente individuabile nei cromatogrammi per la presenza di picchi parzialmente sovrapposti, è dipendente dalla fase stazionaria e dalla forza dell'eluente. Ogni qual volta si verifichi un evento del genere, è necessario modificare la forza dell'eluente oppure cambiare il tipo di colonna, secondo le indicazioni delle case produttrici. In questo paragrafo vengono descritte le più comuni interferenze riscontrabili nelle analisi effettuate con i modelli più diffusi di colonne a scambio anionico.
L'acqua contenuta nel campione iniettato dà luogo ad un picco negativo all'inizio del cromatogramma, in quanto la sua conducibilità è inferiore a quella dell'eluente. Questo picco negativo interferisce con la determinazione degli anioni meno ritenuti, come il fluoruro, e rende meno accurata la determinazione del cloruro, quando presente in concentrazioni inferiori a 0,5 mg/L. Questa interferenza può essere eliminata aggiungendo al campione una piccola aliquota di eluente concentrato (100 µL di eluente concentrato 100 volte per 10 mL di campione). In tal caso un'analoga procedura deve essere utilizzata anche nella preparazione delle soluzioni di riferimento.
Acidi organici poco ritenuti (ad esempio acido acetico e formico) ed elevate quantità di cationi interferiscono con il fluoruro; gli acidi organici, se presenti in concentrazione superiore a 100 mg/L, possono interferire con il cloruro. In questo caso, per determinare il fluoruro è

necessario utilizzare una fase stazionaria con maggiore capacità di ritenzione, oppure utilizzare un eluente con una minore forza ionica. Nel caso si utilizzi un eluente a minore forza ionica non è possibile determinare simultaneamente gli anioni più ritenuti (bromuro, nitrato, fosfato e solfato).
In generale i picchi cromatografici delle coppie cloruro/nitrito e bromuro/nitrato possono presentare una non completa risoluzione in funzione delle concentrazioni relative. In questo caso è necessario ottimizzare la separazione per ottenere un fattore di risoluzione, R>1.
I clorati, presenti in genere solo in acque trattate in processi ossidativi, interferiscono parzialmente, in alcune colonne, con il nitrato. A seconda della fase stazionaria utilizzata, la presenza di acidi organici poliprotici, in particolare l'acido tartarico, può interferire con la determinazione del solfato. L'interferenza si manifesta o come incompleta risoluzione del picco cromatografico del solfato, oppure come peggioramento nella ripetibilità dell'area integrata del picco stesso.
In caso di presenza di sostanze organiche con elevata affinità per resine scambiatrici ioniche a base aromatica, come polifenoli, tensioattivi, acidi umici, può essere necessario purificare il campione mediante filtrazione su cartucce, a base di polivinilpirrolidone polimerizzato, resine macroporose di divinilbenzene o equivalenti, in grado di trattenere selettivamente questo tipo di sostanze. La presenza di queste sostanze si evidenzia sul cromatogramma come disturbi o picchi molto allargati sulla linea di base, a carattere non periodico.
L'analisi frequente di campioni contenenti metalli disciolti può portare col tempo alla perdita delle caratteristiche di efficienza e risoluzione della colonna: è consigliabile purificare questo tipo di campioni mediante filtrazione su cartucce in grado di sequestrare metalli, disponibili commercialmente.
Per campioni contenenti particolato sospeso, si consiglia la filtrazione a 0,45 µm prima dell'iniezione.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il prelievo del campione dovrà essere effettuato in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". A causa dei piccoli volumi analizzati, si deve prestare particolare cura nella manipolazione dei campioni al fine di non introdurre contaminazione negli stessi.
Cloruro, bromuro e fluoruro sono stabili in soluzione. La concentrazione di nitrato, nitrito e fosfato può essere affetta dall'attività biologica del campione, che può essere limitata filtrando a 0,2 µm. La concentrazione di fosfato può essere modificata da reazioni di idrolisi delle forme polimeriche eventualmente presenti nel campione. L'ossidazione di nitrito e solfito, eventualmente presenti, può dar luogo a misure in eccesso rispettivamente di nitrato e solfato. Di conseguenza i campioni devono essere analizzati nel minor tempo possibile dopo il prelievo (al più tardi entro 24 h per il nitrito, ed entro 48 h per gli altri anioni), mantenendo gli stessi a 4°C e al riparo dalla luce fino al momento dell'analisi.

5. Apparecchiature

5.1 Vetreria di laboratorio di classe A

5.2 Cromatografo ionico

Il cromatografo ionico è costituito da: pompa isocratica capace di fornire un flusso da 0,5 a 2,5 mL/min; soppressore chimico od elettrochimico; rivelatore a conducibilità con compensazione della temperatura. Loop di iniezione con volume da 20 a 200 µL.

5.3 Colonna di separazione a scambio anionico

Colonna impaccata con resine pellicolari a bassa capacità, funzionalizzate con gruppi am-

monici quaternari, supportate su polimero a base aromatica, con relativa precolonna di fase analoga, in grado di dare una separazione efficiente dei picchi degli analiti. La colonna scelta deve essere in grado di fornire un'adeguata efficienza e risoluzione nella separazione dei picchi degli analiti: i valori accettabili dei parametri cromatografici (ad una concentrazione di 1 mg/L per ciascun analita) sono i seguenti:

fattore di capacità:	$0,5<k<12$
efficienza:	N>3000 piatti teorici
fattore di risoluzione:	R>1
fattore di asimmetria:	$0<As<4$

Il calcolo di tutti i parametri cromatografici della colonna deve essere effettuato almeno due volte l'anno; per matrici più complesse la verifica deve essere più frequente. Nel caso in cui la colonna non presenti più requisiti cromatografici sufficienti, si deve procedere al lavaggio e rigenerazione della colonna secondo le istruzioni della casa costruttrice, o alla sostituzione della medesima.

5.4 *Sistema di acquisizione dati*, mediante personal computer o integratore.

6. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere di grado analitico. Le soluzioni devono essere preparate con acqua ad elevata purezza, caratterizzata da conducibilità specifica <0,1 µS/cm e filtrata su membrana da 0,2 µm.

6.1 *Carbonato di sodio anidro (Na_2CO_3)*

6.2 *Idrogenocarbonato di sodio ($NaHCO_3$)*

6.3 *Acido solforico concentrato (H_2SO_4; d=1,84 g/L)* (se necessario)

6.4 *Bromuro di sodio (NaBr)*

6.5 *Cloruro di sodio (NaCl)*

6.6 *Fluoruro di sodio (NaF)*

6.7 *Fosfato di potassio monobasico (KH_2PO_4)*

6.8 *Nitrato di sodio ($NaNO_3$)*

6.9 *Nitrito di sodio ($NaNO_2$)*

6.10 *Solfato di potassio (K_2SO_4)*

6.11 *Soluzione eluente: (Na_2CO_3/$NaHCO_3$)*

La molarità deve essere scelta secondo le indicazioni della casa produttrice della colonna. Ad esempio, per una soluzione 1,8 mM Na_2CO_3/1,7 mM $NaHCO_3$: preparare una soluzione concentrata, sciogliendo 19,078 g di Na_2CO_3 e 14,282 g di $NaHCO_3$ in 1 L di acqua. Diluire 100 volte questa soluzione (10 mL in 1 L) in un matraccio tarato. La soluzione concentrata è stabile per sei mesi in bottiglia di polietilene, polipropilene o vetro. L'eluente deve essere preparato fresco ogni qual volta si inizi una sessione di analisi.

6.12 Rigenerante

Soluzione di H_2SO_4: (per i soppressori chimici) la molarità deve essere scelta secondo le indicazioni della casa produttrice della colonna.
Ad esempio, per una soluzione 12,5 mM: portare a 4 L con acqua in matraccio tarato 2,8 mL di H_2SO_4 concentrato.

6.13 Soluzioni di riferimento concentrate

Preparare una serie di soluzioni concentrate di 1000 mg/L di analita, pesando i rispettivi sali conservati in essiccatore e precedentemente essiccati in stufa per almeno 30 min a 105°C. Queste soluzioni, conservate a 4°C al buio in bottiglie di polietilene o polipropilene, sono stabili 6 mesi, eccetto la soluzione di nitrito che è stabile un mese.

6.13.1 Soluzione di riferimento concentrata di bromuro (1000 mg/L)

Sciogliere in acqua 1,288 g di bromuro di sodio (6.4) in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua.

6.13.2 Soluzione di riferimento concentrata di cloruro (1000 mg/L)

Sciogliere in acqua 1,648 g di cloruro di sodio (6.5) in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua.

6.13.3 Soluzione di riferimento concentrata di fluoruro (1000 mg/L)

Sciogliere in acqua 2,210 g di fluoruro di sodio (6.6) in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua.

6.13.4 Soluzione di riferimento concentrata di fosfato (1000 mg/L)

Sciogliere in acqua 1,432 g di fosfato di potassio monobasico (6.7) in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua.

6.13.5 Soluzione di riferimento concentrata di nitrato (1000 mg/L)

Sciogliere in acqua 1,371 g di nitrato di sodio (6.8) in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua.

6.13.6 Soluzione di riferimento concentrata di nitrito (1000 mg/L)

Sciogliere in acqua 1,500 g di nitrito di sodio (6.9) in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua.

6.13.7 Soluzione di riferimento concentrata di solfato (1000 mg/L)

Sciogliere in acqua 1,814 g di solfato di potassio anidro (6.10) in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua.

In sostituzione delle precedenti, si possono usare soluzioni commerciali di opportuna concentrazione, purché in corso di validità e accompagnate da un certificato di analisi che consenta la riferibilità della misura a campioni di riferimento certificati.

7. Procedimento

7.1 Ottimizzazione dei parametri strumentali

Portare tutte le soluzioni di riferimento, i campioni, l'eluente e l'eventuale rigenerante a temperatura ambiente prima di iniziare ogni analisi. Poiché la temperatura influenza i parametri cromatografici, è preferibile mantenere la temperatura del laboratorio controllata durante lo svolgimento della taratura e delle successive analisi.
Accendere il cromatografo, impostare le condizioni strumentali di lavoro, lasciare stabilizzare il sistema per almeno 30 minuti e controllare che la conducibilità sia stabile.

7.1.1 Condizioni cromatografiche

Le condizioni strumentali da controllare sono: il volume d'iniezione; la composizione dell'eluente; il flusso dell'eluente; la conducibilità di fondo; la pressione del sistema. È inoltre importante verificare che sia impostato sul rivelatore il fattore di compensazione della temperatura.
Nel caso di un soppressore chimico a membrana si deve definire e controllare anche il flusso del rigenerante (tipicamente H_2SO_4 12,5 mM a 4-5 mL/min).

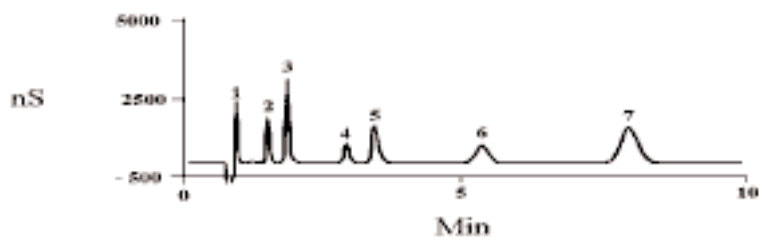


Figura 1: Esempio di cromatogramma di una soluzione di riferimento multipla: 1. F^- (0,5 mg/L), 2. Cl^- (0,5 mg/L), 3. NO_2^- (1,0 mg/L), 4. Br^- (1,0 mg/L), 5. NO_3^- (2,0 mg/L), 6. PO_4^{3-} (3,0 mg/L), 7. SO_4^{2-} (3,5 mg/L)
Volume di iniezione : 50 µL; eluente : 1,8 mM Na_2CO_3/1,7 mM $NaHCO_3$, flusso dell'eluente: 2 mL/min, fattore di compensazione della temperatura 1,7%/°C, colonna: Dionex IonPac AS4A; precolonna Dionex IonPac AG4A.

7.1.2 Verifica della funzionalità strumentale

Raggiunte le condizioni d'analisi, deve essere verificata la perfetta funzionalità strumentale mediante l'iniezione di una soluzione di riferimento, a scelta all'interno dell'intervallo di lavoro. Bisogna verificare la risoluzione tra i picchi e la riproducibilità dei tempi di ritenzione (massimo scostamento ammissibile rispetto all'ultimo controllo dell'efficienza: ±5%) dei singoli analiti. È necessario, inoltre, verificare mediante l'iniezione di un campione d'acqua ad elevata purezza (considerato come bianco) la presenza di eventuali interferenti dovuti al sistema.

7.2 Taratura

La scelta delle modalità di taratura dipende dall'intervallo di concentrazioni che si vuole analizzare con una singola taratura. Per intervalli di concentrazioni fino ad un ordine di grandezza è possibile utilizzare curve di taratura lineari con tre punti, mentre per intervalli di concentrazioni fino a due ordini di grandezza bisogna utilizzare curve di taratura quadratiche o, in alternativa, regressioni lineari pesate, calcolate con almeno cinque livelli di concentrazione. Per le tarature lineari non superiori ad un ordine di grandezza è necessario preparare tre campioni di riferimento a concentrazioni corrispondenti ai due estremi ed al centro dell'intervallo di misura. Ad esempio è possibile dividere l'intervallo di misura definito dall'intero campo di applicabilità del metodo (0,1-100 mg/L) in tre intervalli (0,1-1; 1-10; 10-100 mg/L); per ciascuno dei tre intervalli si devono preparare ed iniettare tre soluzioni di riferimento (per l'intervallo 1-10 mg/L le soluzioni di riferimento devono essere 1 mg/L; 5 mg/L; 10 mg/L).

A seconda della tipologia dei campioni può essere necessario coprire l'intervallo di misura con due o più rette di taratura.
Se si evidenzia uno scostamento dalla linearità (R^2<0,999, oppure variazione dei valori dei fattori di risposta (*), RF, più elevata del ±5% attorno al valore medio di RF), è consigliabile interpolare i punti ottenuti con i campioni di riferimento con una curva di taratura quadratica.
Per le determinazioni su due ordini di grandezza con una sola taratura, è indispensabile ricorrere ad una regressione quadratica o, in alternativa, ad una regressione lineare pesata, calcolate con almeno cinque punti. I campioni di taratura vanno scelti in corrispondenza del valore minimo, massimo, del 5, 10 e 50% dell'intervallo di misura (ad esempio per l'intervallo 0,1-10 mg/L le concentrazioni di riferimento consigliate sono 0,1 mg/L; 0,5 mg/L; 1 mg/L; 5 mg/L e 10 mg/L).
La preparazione dei campioni di taratura multielemento, a partire dalle soluzioni concentrate da 1000 mg/L (6.13) deve essere eseguita aggiungendo accuratamente, in funzione della concentrazione degli analiti desiderati, volumi misurati di soluzioni concentrate in matracci tarati, portando a volume con acqua.
Le soluzioni di taratura a concentrazione bassa (0,1-1 mg/L) devono essere preparate giornalmente mentre quelle a concentrazione più elevata (1-100 mg/L) possono essere utilizzate per una settimana, eccetto quelle che contengono nitrito che devono essere preparate giornalmente.

7.2.1 Iniezione un'aliquota della prima soluzione di riferimento ed acquisizione del cromatogramma.

Il volume di iniezione deve essere uguale per soluzioni di riferimento e campioni. Quando si usa un sistema di iniezione con "loop", esso deve essere condizionato con almeno 3 volumi di campione prima dell'iniezione. L'iniezione può essere effettuata con una siringa o un autocampionatore. Nel caso si usi una siringa di plastica, questa deve essere risciacquata con acqua deionizzata ed avvinata due volte con la soluzione d'analisi prima dell'iniezione. La stessa procedura deve essere adottata per le fiale dell'autocampionatore.
Ripetere l'operazione per le altre soluzioni in modo da costruire una curva di taratura. Verificare la curva di taratura, almeno ogni 25 campioni e alla fine della sessione di analisi, mediante l'iniezione di una soluzione di controllo di concentrazione compresa nell'intervallo di lavoro.
Se il valore dell'area della soluzione di controllo iniettata si discosta per ±5% dal valore dell'area della stessa soluzione di riferimento utilizzata per la curva di taratura, è necessario ripetere la taratura.

7.3 Determinazione

Iniettare un'aliquota del campione ed acquisire il cromatogramma. Per l'iniezione dei campioni bisogna attenersi alle stesse condizioni descritte per le soluzioni di riferimento al Sottoparagrafo 7.2.1.
Il riconoscimento qualitativo degli anioni viene effettuato per confronto con i tempi di ritenzione delle soluzioni di taratura. Nei casi dubbi è necessario assicurarsi della corretta attribuzione effettuando un'aggiunta nota dell'analita al campione e verificando che vi sia un aumento dell'altezza del picco cromatografico relativo.
Completata l'identificazione qualitativa dei picchi, si procede all'analisi quantitativa ricavando le concentrazioni dalla curva di taratura.
Nel caso la concentrazione del campione oltrepassasse il limite superiore della taratura, utilizzare delle soluzioni di taratura a maggiore concentrazione nei limiti imposti dal campo di applicazione del metodo (vedi Capitolo 2). Per concentrazioni superiori si deve diluire il campione.

(*) Il fattore di risposta RF può essere facilmente calcolato per ogni concentrazione di riferimento come:
(Area del picco)/(concentrazione della soluzione di riferimento) = RF
In caso di perfetta linearità della curva di taratura e di intercetta nulla i valori di RF sono uguali per ogni valore di concentrazione.

Campioni aventi concentrazioni inferiori al limite di applicabilità possono essere analizzati aumentando il volume di iniezione fino a 200 µL. La preparazione delle soluzioni di riferimento e la taratura in questo intervallo di concentrazioni è però molto delicata; si consiglia, perciò, di preparare le soluzioni di riferimento con la soluzione eluente e di tarare con cinque soluzioni di riferimento nell'intervallo 0,05-0,5 mg/L.

8. Calcoli

La concentrazione degli anioni nel campione si ricava dalla curva di taratura costruita per ciascun analita.

9. Qualità del dato

Il metodo è stato validato per gli anioni più frequentemente analizzati (cloruro, nitrato e solfato) mediante un esercizio di interconfronto condotto da 11 laboratori italiani qualificati appartenenti ad enti pubblici e privati. Questo esercizio è stato effettuato analizzando due campioni multicomponenti sintetici, preparati per lo scopo, e due campioni certificati (acqua di pioggia artificiale SRM 2694-I e 2694-II) forniti dal National Institute of Standards (NIST). Dall'analisi ANOVA dei dati ottenuti dai laboratori, dopo eliminazione degli outlier secondo procedure normate, si sono ricavate la ripetibilità e la riproducibilità del metodo alle concentrazioni in esame in matrici sintetiche (Tab. 1).

Tabella 1: Risultati delle prove di validazione interlaboratorio: ripetibilità e riproducibilità. Media (X), deviazione standard della ripetibilità (S_r), deviazione standard della riproducibilità (S_R),limite di ripetibilità (r); limite di riproducibilità (R) espressi in mg/L e calcolati secondo le norme ISO 5725.

	n lab	n campioni	X	S_r	CV	S_R	CV	$^a r$	$^b R$
cloruro	7	2	0,26	0,030	11,5	0,047	18,1	0,08	0,13
			0,43		7,0		19,9		
	7	1	1,05	0,038	3,6	0,040	3,8	0,11	0,11
	6	1	13,8	0,23	1,7	0,32	2,3	0,65	0,90
nitrato	6	1	1,00	0,025	2,5	0,036	3,6	0,070	0,10
	7	2	7,09	0,18	2,5	0,26	3,7	0,50	0,73
			8,65		2,1		2,1		
solfato	7	2	1,63	0,072	4,4	0,097	5,9	0,20	0,27
			2,76		2,6		3,5		
	6	2	10,8	0,17	1,6	0,33	3,1	0,49	0,92
			13,8		1,2		2,4		2,4

$^a r = 2,8\ S_r$
$^b R = 2,8\ S_R$

Dati di ripetibilità e riproducibilità relativi agli anioni fluoruro, bromuro, fosfato e nitrito, e ulteriori dati per cloruro, nitrato e solfato, ottenuti per intervalli diversi di concentrazione e matrici diverse, sono riportati nei metodi ufficiali di organizzazioni internazionali.
L'accuratezza del metodo è stata dimostrata confrontando i valori medi di concentrazione per i tre analiti, ottenuti nell'esercizio di interconfronto, coi valori certificati dei materiali di riferimento (Tab. 2).

Tabella 2: Risultati delle prove di validazione interlaboratorio: accuratezza. Media (X), intervallo di confidenza (CI), valore certificato (μ) espressi in mg/L e calcolati secondo le norme ISO 5725.

	n lab	X	CI°	μ
cloruro	7	0,26	0,26±0,08	(0,24)*
	7	1,05	1,05±0,11	(1,0)*
nitrato	7	7,09	7,09±0,50	7,06±0,15
solfato	7	2,76	2,76±0,20	2,75±0,05
	6	10,8	10,8±0,49	10,9±0,2

° *CI = X±r*
* *valori indicativi non certificati*

BIBLIOGRAFIA

ASTM (1992): "*Standard test method for anions in water by chemically suppressed ion chromatography*", D4327, *Annual Book of ASTM Standards, vol. 11.01 Water*, Philadelphia.

CAMUSSO M. & POLESELLO S. (1999): "Determinazione di cloruro, nitrato, solfato mediante cromatografia ionica", *Notiziario dei Metodi Analitici IRSA*, Settembre 1999, 1-14.

ISO (1992): "*Water quality. Determination of dissolved fluoride, chloride, nitrite, orthophosphate, bromide, nitrate and sulfate ions, using liquid chromatography of ions. Part 1: Method for water with low contamination*", *Method 10304-1* ISO, Geneva.

ISO (1994): "*Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results", Method 5725, Parte 1-6,* ISO, Geneva.

ISO (1995): "*Water quality. Determination of dissolved anions by liquid chromatography of ions. Part 2: Determination of bromide, chloride, nitrate, nitrite, orthophosphate and sulfate in waste water", Method 10304-2,* ISO, Geneva.

IUPAC (1995): "Protocol for the design, conduct and interpretation of method-performance studies", *Pure & Appl. Chem.*, **67,** 331-343.

YOUDEN W.J. & STEINER E.H. (1975): "*Statistical Manual of the Association of Official Analytical Chemists*", AOAC, Arlington, VA.

APPENDICE

1. Valutazione dei parametri cromatografici di una separazione

1.1 Valutazione del fattore di capacità k

Definendo un *tempo di ritenzione corretto*

$$t'_r = t_r - t_m$$

ove t_r è il tempo di ritenzione dell'analita e t_m il tempo necessario alla fase mobile per arrivare al rivelatore, si può calcolare il *fattore di capacità*:

$$k = t'_r / t_m$$

1.2 Valutazione del fattore di risoluzione R

La risoluzione R tra due picchi si calcola, in accordo con la farmacopea statunitense (USP), secondo la seguente equazione:

$$R_{2,1} = \frac{2 \cdot (t_{R2} - t_{R1})}{(W_{2b} + W_{1b})}$$

$R_{2,1}$	è la risoluzione tra la coppia di picchi 2,1
t_{R1}	è il tempo di ritenzione, in secondi, del primo dei due picchi
t_{R2}	è il tempo di ritenzione, in secondi, del secondo picco
W_{1b}	è l'ampiezza alla base del primo picco, misurato in secondi sulla scala dei tempi
W_{2b}	è l'ampiezza alla base del secondo picco, misurato in secondi sulla scala dei tempi

W_{1b}, W_{2b} sono le ampiezze alla base del triangolo isoscele costruito sul picco Gaussiano, generato tracciando le tangenti ai punti di flesso (Fig. 1).

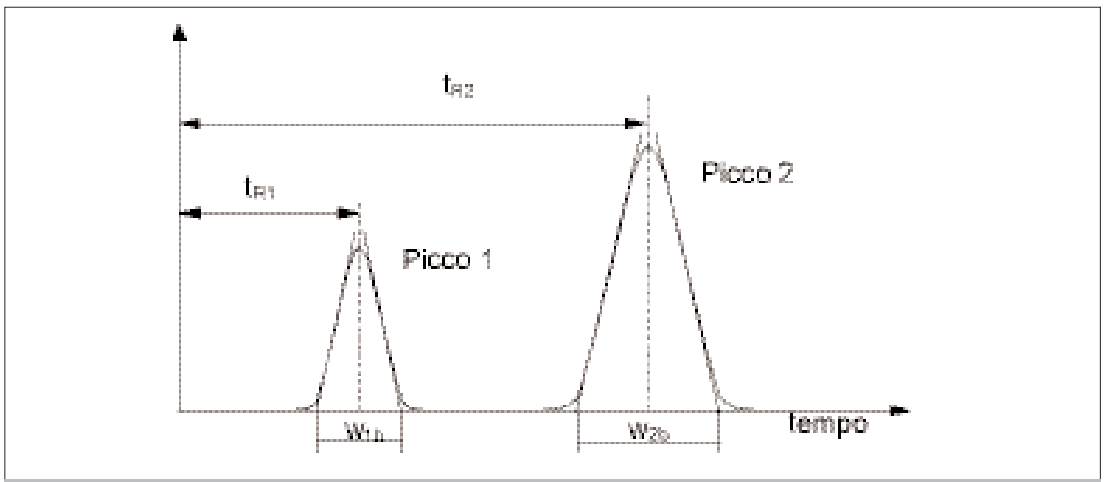


Figura 1: Rappresentazione grafica del calcolo della risoluzione R tra due picchi.

1.3 Valutazione dell'efficienza

L'efficienza della colonna può essere espressa in *numero di piatti teorici*, *N*, calcolati secondo la seguente equazione:

$$N = 16\,(t_r/w_b)^2$$

dove:
t_r = tempo di ritenzione dell'analita;
w_b = ampiezza alla base del picco, misurato in secondi sulla scala dei tempi.

1.4 Valutazione del fattore di asimmetria A_s

La simmetria dei picchi viene espressa, quantitativamente, dall'equazione:

$$A_s = b/a$$

ove *b* e *a* sono le distanze della curva dalla verticale nel punto di massimo, misurate al livello del 10% dell'altezza del picco, rispettivamente dopo e prima del punto di massimo (Fig. 2).

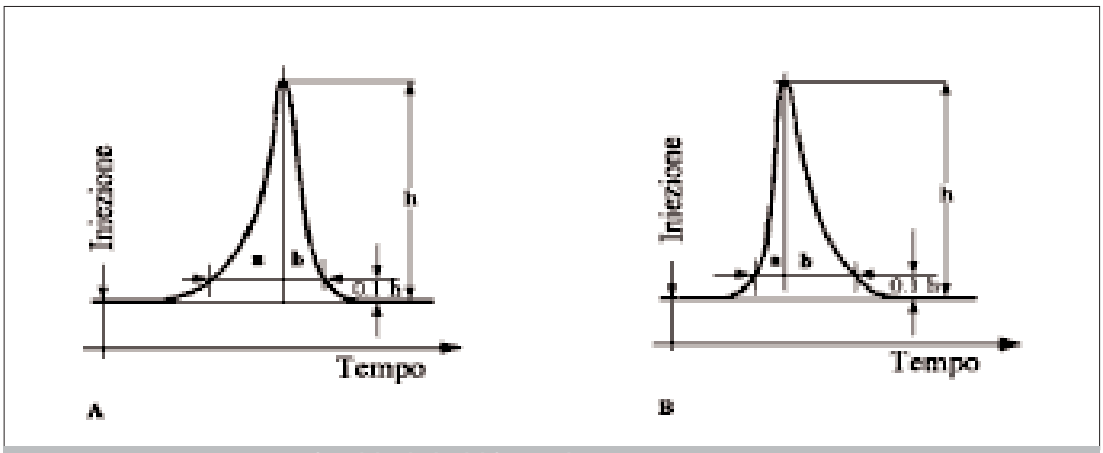


Figura 2: Rappresentazione grafica del calcolo del fattore di asimmetria.

4030. Azoto ammoniacale

Nel seguito vengono descritti quattro metodi per la determinazione dell'azoto ammoniacale nelle acque:

metodo A1 - Determinazione spettrofotometrica all'indofenolo;
metodo A2 - Determinazione spettrofotometrica mediante reattivo di Nessler;
metodo B - Determinazione potenziometrica;
metodo C - Determinazione spettrofotometrica mediante reattivo di Nessler o titrimetrica con acido solforico, previa distillazione.

La scelta del metodo più indicato dipende dalle concentrazioni attese e dalla presenza di eventuali sostanze interferenti. In generale, i metodi A1 e B si applicano ad acque superficiali e sotterranee, mentre per le acque di scarico è consigliabile utilizzare il metodo A2.
Nel caso in cui si sospetti la presenza di sostanze interferenti è necessario ricorrere ad una preliminare distillazione del campione (metodo C).

METODO A1 - Determinazione spettrofotometrica all'indofenolo

1. Principio del metodo

L'ammoniaca per reazione con salicilato sodico e cloro forma un derivato dell'indofenolo, il quale, in ambiente nettamente alcalino ed in presenza di nitroprussiato sodico che agisce da catalizzatore, assume una colorazione verde-blu, misurabile spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda di 690 nm. L'aumento delle concentrazioni dei reagenti può determinare la reazione di composti organici azotati labili ed una diminuzione dei tempi di reazione. La reazione che porta alla formazione dell'indofenolo è caratterizzata da un meccanismo complesso; probabilmente si forma una cloroimmide chinonica in uno step intermedio.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile alle acque naturali, dolci, salmastre o marine e alle acque sotterranee. L'intervallo di concentrazione utile è compreso tra 0,05 e 2,00 mg/L di NH_4^+, utilizzando celle di 1 cm di cammino ottico. Il campo può essere esteso a concentrazioni superiori a 2 mg/L previa diluizione del campione.
Nel caso di concentrazioni molto basse si possono impiegare celle di cammino ottico superiore. A titolo esemplificativo, per celle da 4 cm l'intervallo di concentrazione utile è compreso tra 0,01 e 0,2 mg/L.

3. Interferenze e cause di errore

Sali di rame, zinco e ferro interferiscono se i rispettivi ioni sono presenti in concentrazione 100 volte superiore a quella dell'ammoniaca. Lo ione mercurio dà interferenza negativa in quanto viene complessato dall'ammoniaca.
La complessazione degli ioni calcio e magnesio mediante aggiunta della soluzione di citrato

di sodio (6.4) elimina l'interferenza prodotta dalla precipitazione di questi ioni al pH nettamente alcalino richiesto dal metodo.
Non interferiscono i comuni sali di sodio, potassio e bario (ad esempio: cloruro di sodio, solfato di sodio, nitrato di potassio, cloruro di bario).
I bromuri danno interferenza a concentrazione superiore a 150 mg/L (espresso come KBr).
L'urea non interferisce fino ad una concentrazione di 1 g/L. Fino alle concentrazioni indicate tra parentesi, le seguenti sostanze danno interferenza trascurabile: morfolina (10 mg/L), cicloesilammina (80 mg/L), idrazina (40 mg/L), n-ottadecilammina (8 mg/L).
Idrossilammina, o-amminofenolo, m-fenilendiammina danno interferenze trascurabili. Le ammine alifatiche invece interferiscono se presenti in quantità 100 volte superiore a quella dell'ammoniaca.
L'eventuale eccesso di acidità dell'acqua in esame si elimina con la preventiva neutralizzazione del campione.
La torbidità, il colore e l'idrogeno solforato possono interferire; tali interferenze si eliminano o per semplice diluizione oppure mediante distillazione.
Altre eventuali interferenze possono essere eliminate ugualmente mediante diluizione o distillazione.
In campioni ricchi di CO_2 (es.: acque gasate naturali) si possono avere difficoltà nell'ottenere un pH nettamente alcalino come richiesto dal metodo. In questi casi è necessario controllare il pH del campione dopo aggiunta dei reattivi, portando eventualmente una nuova aliquota di campione a neutralità con idrossido di sodio prima prima di procedere all'esecuzione del metodo. Poiché l'idrossido di sodio può contenere ammoniaca come impurezza, il controllo dell'eventuale contaminazione può essere eseguito aggiungendo gli stessi volumi di soluzione di idrossido di sodio alle soluzioni di taratura e al bianco dei reattivi.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campione di acqua deve essere prelevato in bottiglie di vetro conformemente a quanto disposto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". In particolare, il campione deve essere conservato alla temperatura di 4°C ed analizzato possibilmente entro le 24 ore, oppure congelato a – 20°C. In alternativa, il campione, filtrato su filtri da 0,45 µm, deve essere mantenuto ad un pH inferiore a 2, mediante aggiunta di acidi sufficientemente concentrati in modo da non diluire significativamente il campione, e conservato ad una temperatura di 4°C. In questo caso il campione deve essere neutralizzato con idrossido di sodio prima dell'analisi. Poiché l'acido e l'idrossido utilizzati possono contenere ammoniaca come impurezza, è opportuno evitare la loro aggiunta, se non strettamente necessario, nel caso di determinazioni di ammoniaca in tracce. In questo caso assicurarsi che i prodotti utilizzati siano di caratteristiche tali da minimizzare i rischi di contaminazione.
Il controllo dell'eventuale contaminazione dovuta all'aggiunta dei suddetti reattivi può essere eseguito misurando l'assorbanza di un bianco preparato con le stesse aggiunte di acido o di idrossido di sodio effettuate sul campione.

5. Apparecchiature

5.1 *Spettrofotometro*, munito di celle aventi cammino ottico di 1 cm o superiore.

5.2 *Vetreria normale di laboratorio*

Lavare accuratamente tutta la vetreria con acqua ultrapura e, periodicamente (ogni 2-3 mesi), eseguire un lavaggio con acido solforico concentrato seguito da un risciacquo con acqua deionizzata. Evitare contaminazioni da parte dell'ambiente.

6. Reattivi

6.1 Acqua deionizzata ultrapura

6.2 Soluzione di nitroprussiato di sodio e salicilato di sodio

Sciogliere 0,5 g di pentacianonitrosilferrato (III) di sodio diidrato [$Na_2Fe(CN)_5NO \cdot 2H_2O$] (nitroprussiato di sodio) e 42,5 g di sodio salicilato in 250 mL di acqua (6.1).
La soluzione va conservata in bottiglia di vetro scuro ed è stabile per due settimane.

6.3 Soluzione di dicloroisocianurato di sodio (5,8 g/L)

Sciogliere 0,116 g di dicloroisocianurato di sodio in 20 mL di acqua**.** La soluzione va preparata di fresco al momento dell'analisi.

6.4 Soluzione alcalina di citrato di sodio (200 g/L)

Sciogliere in acqua 100 g di citrato trisodico diidrato ($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$) e 10 g di idrossido di sodio (NaOH) e diluire a 500 mL con acqua. Conservare in bottiglia di plastica. La soluzione è stabile per sei mesi.

6.5 Soluzione ossidante

Mescolare 80 mL di soluzione alcalina di citrato di sodio (6.4) e 20 mL di soluzione di dicloroisocianurato di sodio (6.3). La soluzione va preparata al momento dell'uso.

6.6 Soluzione di idrossido di sodio 0,1 M

Sciogliere in acqua 4 g di idrossido di sodio (NaOH) e diluire a 1 litro con acqua. Conservare in bottiglia di plastica.

6.7 Soluzioni di riferimento di cloruro di ammonio

6.7.1 Soluzione concentrata (1 mL=0,5 mg NH_4^+)

Pesare, con l'approssimazione di 1 mg, 1,483 g di cloruro di ammonio anidro (NH_4Cl), essiccato per 2 ore a 100°C; sciogliere in acqua e diluire a 1 litro con acqua in matraccio tarato.

6.7.2 Soluzione diluita (1 mL=0,005 mg NH_4^+)

Introdurre 10 mL della soluzione concentrata (6.7.1) in un matraccio tarato da 1 litro e diluire a volume con acqua.

7. Procedimento

7.1. Taratura

Costruire la curva di taratura utilizzando almeno tre soluzioni di lavoro scelte nel campo di indagine analitico, preparate trasferendo, avendo cura di evitare il contatto con l'atmosfera del laboratorio, volumi opportuni di soluzione diluita di cloruro di ammonio (6.7.2) in matracci tarati da 100 mL e portando a volume con acqua. Trasferire, con pipetta tarata, 50 mL di queste soluzioni in beute con tappo a vite ed aggiungere nell'ordine *(operare sotto cappa)*, agitando dopo ogni aggiunta, 2 mL di soluzione di nitroprussiato e salicilato di sodio (6.2) e 2 mL di soluzione ossidante (6.5). Lasciare ciascun campione a riposo per almeno 4 ore a 20-22°C e misurare allo spettrofotometro entro le 24 ore le assorbanze delle soluzioni alla lunghezza d'onda di 690 nm.

7.2 Dosaggio del campione

In una beuta da 100 mL introdurre 50 mL di campione, oppure una aliquota minore, eventualmente neutralizzata con NaOH 0,1 M (6.6) e diluita a 50 mL con acqua, e procedere come descritto per le soluzioni di taratura.

8. Calcoli

La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le concentrazioni (mg/L) in ascissa e le assorbanze corrispondenti, corrette del bianco dei reattivi, in ordinata. I valori di assorbanza dei bianchi sono solitamente compresi tra 0,010 e 0,035 per le celle da 4 cm e tra 0,002 e 0,010 per quelle da 1 cm. La regressione può essere considerata accettabile se la deviazione standard della retta stimata è inferiore al 10%. Calcolare quindi la concentrazione di NH_4^+ nel campione utilizzando l'equazione ottenuta, tenendo conto dell'eventuale diluizione effettuata.

9. Qualità del dato

Per valutare le caratteristiche di precisione e accuratezza sono state effettuate misure su soluzioni di N-NH_4^+ in acqua deionizzata (2-3 litri), opportunamente stabilizzate, preparate secondo la metodologia delle carte di controllo. Dati acquisiti su periodi lunghi di esercizio della carta (2-3 mesi) hanno consentito di calcolare i valori medi e le ripetibilità, espresse come coefficiente di variazione (CV) = (scarto tipo/valore medio)·100, riportati in tabella.

concentrazione (mg/L)	CV (%)
0,046	8,2
0,177	2,1
0,32	3,4
0,475	2,0
0,94	2,4
1,055	1,5

L'accuratezza del metodo è dell'ordine del ±10÷15%.

Nota: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti su materiali di riferimento certificati, prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".*

Caratterizzato il materiale di riferimento non certificato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, è possibile verificare gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

METODO A2 – Determinazione spettrofotometrica mediante reattivo di Nessler

1. Principio del metodo

L'ammoniaca, (libera o idrolizzata) presente in un'acqua, reagisce con una soluzione alcalina di iodo-mercurato di potassio (reattivo di Nessler) per formare un complesso colorato secondo la reazione:

$$2(HgI_2+KI)+2NH_3 \rightarrow 2(NH_3HgI_2)+2KI$$

$$2(NH_3HgI_2) \rightarrow NH_2Hg_2I_3 + NH_4I$$

L'assorbanza del complesso colorato viene misurata alla lunghezza d'onda di 420 nm.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile nell'intervallo 0,4–4 mg/L.

3. Interferenze e cause di errore

Il calcio, il magnesio, il ferro e i solfuri possono provocare un intorbidimento in presenza del reattivo di Nessler; pertanto è opportuno precipitarli preventivamente aggiungendo al campione in esame del solfato di zinco ed una base.
La presenza del flocculante $Zn(OH)_2$ è particolarmente utile nel caso di acque torbide o colorate per la rimozione delle sostanze in sospensione e delle sostanze colorate.
Inoltre, affinché gli ioni calcio e magnesio rimasti in soluzione non precipitino in presenza del reattivo di Nessler alcalino, si aggiunge al campione in esame una soluzione stabilizzante di EDTA o di sale di Seignette.
Ammine alifatiche e aromatiche, cloroammine, chetoni, aldeidi, alcool possono produrre una colorazione anormale (giallastra o verdastra) o un intorbidimento dopo l'aggiunta del reattivo di Nessler. Tali interferenze sono difficilmente trattabili, in quanto non si conosce alcun procedimento specifico per la loro rimozione totale; tuttavia, se dovessero manifestarsi, si consiglia di ricorrere alla distillazione del campione.
Alcune sostanze volatili interferenti, come la formaldeide, possono essere rimosse mediante ebollizione a basso pH prima dell'aggiunta del reattivo.

4. Campionamento e conservazione del campione

Nel dosaggio dell'ammoniaca, i risultati più attendibili si ottengono su campioni prelevati di fresco, in quanto la concentrazione di tale sostanza può variare rapidamente in seguito alla sua utilizzazione da parte dei consorzi batterici presenti nell'acqua.
Pertanto, nell'eventualità che non sia possibile effettuare subito il dosaggio, è opportuno aggiungere 0,8 mL di H_2SO_4 concentrato per litro di campione o comunque un volume tale da realizzare un pH compreso tra 1,5 e 2 e conservare il campione a 4°C al fine di bloccare l'attività biologica.
Se il campione è stato stabilizzato in ambiente acido, neutralizzare il campione aggiungendo NaOH o KOH immediatamente prima della determinazione.
Il cloro residuo eventualmente presente deve essere rimosso immediatamente dopo il prelievo, aggiungendo al campione una quantità equivalente di una soluzione riducente (6.5).

5. Apparecchiature

5.1 *Spettrofotometro* per misure nel campo del visibile dotato di celle con cammino ottico di 1 cm.

5.2 *pHmetro*, con elettrodo di vetro per misure di pH alcalino.

6. Reattivi

Tutti i reagenti devono essere puri per analisi e l'acqua deionizzata ad elevato grado di purezza.

6.1 *Soluzione di solfato di zinco*

Sciogliere 100 g di $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ in acqua bidistillata e diluire a 1 litro.

6.2 Soluzione di idrossido di sodio 6 M

Sciogliere 120 g di NaOH in 500 mL di acqua e diluire a 1 litro.

6.3 Soluzioni stabilizzanti

Allo scopo di impedire la precipitazione del calcio e del magnesio quando si aggiunge ad un'acqua il reattivo di Nessler, viene impiegata una soluzione di EDTA oppure una soluzione di sale di Seignette.

6.3.1 Soluzione di EDTA

Sciogliere 50 g di sale disodico dell'acido etilendiamminotetracetico in 60 mL di acqua contenente 10 g di NaOH pura. Se necessario, scaldare debolmente per ottenere la solubilizzazione completa della sostanza. Lasciar raffreddare a temperatura ambiente e diluire a 100 mL.

6.3.2 Soluzione sale di Seignette

Sciogliere 50 g di tartrato di sodio e potassio tetraidrato ($NaKC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$) in 100 mL di acqua. L'ammoniaca generalmente presente nel sale di Seignette può essere allontanata portando all'ebollizione 30 mL di soluzione; dopo raffreddamento a temperatura ambiente riportare la soluzione a 100 mL con acqua.

6.4 Reattivo di Nessler

6.5 Soluzione ad azione declorante

Sciogliere 3,5 di $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ in acqua e diluire a 1 litro.

6.6 Soluzione concentrata di cloruro di ammonio (1 mL=1 mg di N-NH_3)

Sciogliere 3,819 g di cloruro di ammonio anidro (NH_4Cl), seccato a 110°C, in acqua e diluire a 1 litro.

6.7 Soluzione diluita di cloruro di ammonio (1 mL=0,01 mg di N-NH_3)

Prelevare 1 mL della soluzione (6.6) e diluire a 1 litro con acqua.

7. Procedimento

7.1 Taratura

Prelevare, ad esempio, 2,5 mL; 5 mL; 10 mL; 15 mL e 20 mL di soluzione (6.7) e portare a volume a 50 mL. Aggiungere la soluzione stabilizzante (1 goccia di reattivo EDTA o 2 gocce di sale di Seignette) e miscelare bene.
Aggiungere 2 mL di reattivo di Nessler (se si è utilizzata la soluzione di EDTA) o 1 mL (se si è utilizzata la soluzione di sale di Seignette), miscelare bene, attendere 15 minuti e misurare l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 420 nm. Il tempo di attesa di 15 minuti, prima della lettura allo spettrofotometro, risulta sufficiente a garantire lo sviluppo completo del colore prima che inizi la flocculazione del complesso colorato $NH_2Hg_2I_3$.

7.2 Dosaggio del campione

Se il campione in esame contiene cloro residuo, questo deve essere preventivamente rimosso

aggiungendo al campione una quantità equivalente di una soluzione ad azione declorante. Utilizzare 0,2 mL di soluzione 6.5 per rimuovere 1 mg/L di cloro residuo in 100 mL di campione.
Aggiungere 1 mL di soluzione di $ZnSO_4$ a 100 mL del campione in esame: miscelare bene, e quindi aggiungere 0,4-0,5 mL di una soluzione idrossido di sodio (6.2) fino ad ottenere un pH di 10,5 avendo cura di controllare tale valore con un pHmetro.
Lasciar riposare per pochi minuti il campione trattato: nel frattempo si avrà la formazione di un precipitato che rende il liquido soprastante limpido ed incolore.
Chiarificare per centrifugazione o per filtrazione. Se si utilizza il processo di filtrazione, il filtro di carta non deve contenere ammoniaca. A tal fine è opportuno lavare accuratamente il filtro con acqua deionizzata fino a quando il filtrato non dia più reazione con il reattivo di Nessler. A questo punto filtrare il campione trattato, scartando la prima porzione di 25 mL di filtrato.
Prelevare 50 mL di filtrato o una aliquota inferiore diluita a 50 mL con acqua deionizzata. Aggiungere la soluzione stabilizzante (1 goccia di reattivo EDTA o 2 gocce di soluzione di sale di Seignette) e miscelare bene.
Aggiungere 2 mL di reattivo di Nessler (se si è utilizzata la soluzione di EDTA) o 1 mL (se si è utilizzata la soluzione di sale di Seignette), miscelare bene, attendere 15 minuti e misurare l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 420 nm.

8. Calcoli

Dal valore dell'assorbanza, corretto del valore del bianco, risalire alla concentrazione di azoto ammoniacale utilizzando la curva di taratura.
Nel caso sia stata eseguita una diluizione del campione, moltiplicare il risultato per il fattore di diluizione.

9. Qualità del dato

Vedi Paragrafo 9 del metodo C.

METODO B - Determinazione potenziometrica con elettrodo a membrana a diffusione gassosa

1. Principio del metodo

Il metodo si basa sull'impiego dell'elettrodo specifico del tipo a diffusione gassosa per la determinazione dell'ammoniaca in campioni di acqua previamente alcalinizzati. Una membrana permeabile al gas consente il passaggio dell'ammoniaca dalla soluzione in esame alla soluzione interna all'elettrodo; l'entità di tale passaggio dipende dalla concentrazione dell'ammoniaca nella soluzione in esame ed è quantitativamente misurata attraverso una variazione del pH dello strato di elettrolita a più stretto contatto con la parete interna della membrana. Il metodo è di facile manualità e rapida esecuzione.

2. Campo di applicazione

Il metodo può essere applicato alle acque naturali, dolci, salmastre e di mare; alle acque sotterranee e, con gli opportuni accorgimenti, agli scarichi industriali e domestici. La determinazione può anche essere effettuata in soluzioni colorate o torbide.

L'intervallo di concentrazione utile è compreso tra 0,5 e 1000 mg/L di N-NH_3(*) per determinazione diretta.

3. Interferenze e cause di errore

Metilammina ed etilammina interferiscono fornendo valori in eccesso di ammoniaca ed inoltre per concentrazioni maggiori di 6 e 9 mg/L rispettivamente, corrispondenti a circa 3 mg/L di N-NH_3, l'elettrodo non si stabilizza; anche idrazina, cicloesilammina ed ammine alifatiche a 6, 7 o 8 atomi di carbonio interferiscono per concentrazioni maggiori di 1 mg/L.
Il mercurio e l'argento formano complessi che interferiscono negativamente. L'aggiunta della soluzione di idrossido di sodio/EDTA (6.2) consente di eliminare l'interferenza.
Urea, cloroammina e amminoacidi inferiori, in particolare l'acido amminoacetico e l'acido aspartico, non interferiscono.
Tra i tensioattivi, interferiscono soltanto quelli ionici. In particolare i tensioattivi cationici forniscono valori in eccesso se presenti a concentrazione maggiore di 1 mg/L, mentre gli anionici, se presenti a concentrazione maggiore di 50 mg/L, provocano lo sfaldamento della membrana, avvertibile da un suo viraggio al colore giallo. Questa interferenza può essere eliminata per distillazione.
La temperatura deve essere la stessa entro ±1°C per tutte le operazioni. Analogamente, ai fini di una maggiore precisione e accuratezza delle misure è opportuno che anche la forza ionica vari entro limiti modesti, eventualmente con l'impiego di un tampone di forza ionica. Comunque la determinazione non viene pregiudicata dalla impossibilità di operare secondo questo accorgimento. Discorso analogo può farsi per la pressione osmotica, per la quale, se possibile, deve evitarsi una differenza troppo marcata di valori per le due soluzioni a contatto con le due facce della membrana.
Particolare attenzione infine deve essere posta nel controllo dell'integrità della membrana.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campione di acqua deve essere prelevato in bottiglie di vetro conformemente a quanto disposto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".
Il campione deve essere conservato alla temperatura di 4°C. Nel caso in cui l'analisi non possa essere eseguita entro le 24 ore dal campionamento, il campione deve essere portato ad un pH inferiore a 2 mediante aggiunta di acido solforico (1 mL/L di H_2SO_4 concentrato).

5. Apparecchiature

5.1 Elettrometro con scala espansa

L'elettrometro deve essere in grado di apprezzare variazioni di ±0,5 mV e deve essere possibilmente fornito di sistema a compensazione (controcorrente) e di registratore grafico.

5.2 Elettrodo a membrana

Elettrodo a membrana a diffusione gassosa per "ammoniaca". L'elettrodo deve essere conservato seguendo rigorosamente le istruzioni della ditta costruttrice.
Prima dell'uso l'efficienza dell'elettrodo deve essere verificata eseguendo i seguenti controlli: pendenza (è funzione della temperatura), tempo di risposta (è funzione della concentrazione di ammoniaca), riproducibilità, intervallo di concentrazione con risposta lineare.

(*) Se la concentrazione deve essere espressa in mg/L di NH_4, tutti i valori di concentrazione espressi in mg/L di N vanno moltiplicati per il fattore di conversione 1,2879.

Prove eseguite con un elettrodo commerciale di buona qualità, conservato in una soluzione 10^{-4} M in cloruro di ammonio e 10^{-1} M in idrossido di sodio, hanno fornito i seguenti risultati:

- tempo di risposta: per concentrazioni dell'ordine di 1 mg/L di N-NH_3 il tempo di risposta è dell'ordine dei 20÷30 s e comunque non superiore ai 60÷80 s;
- ripetibilità dei dati: intorno al 5%;
- intervallo di concentrazione in cui il diagramma potenziale dell'elettrodo-logaritmo della concentrazione è lineare: 1÷1000 mg/L; il limite inferiore può essere abbassato fino a 0,1 mg/L a condizione di operare con ambientamento dell'elettrodo in tampone a pH=4 per qualche ora, con grandi volumi di campione (dell'ordine del litro) e tempi più lunghi di stabilizzazione.
- coefficiente angolare del tratto lineare del suddetto grafico (esso è funzione della temperatura):
  - 57,5 mV per decade di concentrazione a 18°C,
  - 59,5 mV per decade di concentrazione a 25°C.

5.3 Agitatore

Agitatore meccanico, possibilmente ad acqua; in sua mancanza, agitatore elettromagnetico.

5.4 Termostato

Le misure devono essere preferibilmente eseguite in termostato a ±1°C.

6. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e le soluzioni preparate con acqua deionizzata ad elevato grado di purezza.

6.1 Soluzione di idrossido di sodio 10 M

Sciogliere 400 g di idrossido di sodio (NaOH, esente da ammoniaca) in 800 mL di acqua, lasciare raffreddare e diluire ad 1 L con acqua.

6.2 Soluzione di idrossido di sodio/EDTA

Sciogliere 400 g di idrossido di sodio (NaOH, esente da ammoniaca) in 800 mL di acqua. Raffreddare, aggiungere 45,2 g di sale sodico dell'acido etilendiamminotetracetico (Na_4EDTA·$4H_2O$) e portare a volume a 1000 mL.

6.3 Soluzione concentrata di cloruro di ammonio (1,0 mL=1,0 mg N-NH_3)

Trasferire 3,819 g di cloruro di ammonio anidro (NH_4Cl), seccato a 110°C, in matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua.

6.4 Acqua di mare sintetica

Qualora si analizzino campioni di acqua marina, la soluzione (6.3) deve essere preparata sciogliendo il cloruro di ammonio in acqua di mare sintetica preparata sciogliendo in 1 L di acqua i seguenti sali esenti da ammoniaca:

NaCl	24,53 g
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	11,1 g
Na_2SO_4	4,09 g
$CaC1_2 \cdot 2H_2O$	1,54 g
KCl	0,69 g
$NaHCO_3$	0,2 g
KBr	0,1 g
H_3BO_3	0,03 g
$SrCl_2 \cdot 6H_2O$	0,05 g
NaF	0,003 g

7. Procedimento

Si possono applicare tanto il metodo della retta di taratura che quello delle aggiunte. In ogni caso la soluzione in esame deve essere preliminarmente alcalinizzata a pH intorno a 12.

7.1 Metodo della retta di taratura

Preparare soluzioni a concentrazione nota di ammoniaca nell'intervallo 0,5÷1000 mg/L diluendo opportunamente la soluzione 6.3. Aggiungere 1 mL della soluzione di NaOH (6.1) - o 1 mL di NaOH/EDTA (6.2) nel caso siano presenti ioni argento o mercurio - a 1000 mL di soluzione; immergere l'elettrodo nella soluzione, chiudere il beaker contenitore con parafilm e agitare la soluzione energicamente, ma non tanto da provocare vortici.
A stabilizzazione raggiunta leggere il potenziale dell'elettrodo a membrana contro un elettrodo di riferimento(*) procedendo dalle soluzioni più diluite a quelle più concentrate.
Costruire la retta di taratura riportando in ascissa il logaritmo della concentrazione di $N\text{-}NH_3$ e in ordinata il potenziale dell'elettrodo.
Procedere all'analisi del campione seguendo le modalità descritte per le soluzioni di taratura.

7.2 Metodo delle aggiunte

Aggiungere a 100 mL di campione 1 mL della soluzione di NaOH (6.1) - o 1 mL di NaOH/EDTA (6.2) nel caso siano presenti ioni argento o mercurio – e 10 mL di soluzione di cloruro di ammonio avente una concentrazione C quanto più possibile vicina a dieci volte quella della soluzione incognita, leggendo il potenziale prima e dopo l'aggiunta.
Dal valore della differenza di potenziale (ΔE) è possibile ricavare la concentrazione incognita C_x, nota quella della soluzione di riferimento C_s, utilizzando i dati tabulati di ΔE e Q riportati nei manuali forniti dalle case costruttrici a corredo delle singole apparecchiature.

8. Calcoli

8.1 Metodo della retta di taratura

Ricavare dalla retta di taratura E=f (log $C_{N\text{-}NH_3}$) la concentrazione dell'ammoniaca nel campione in esame.

8.2 Metodo delle aggiunte

Definiti ΔE il valore in mV della differenza di potenziale (E_1–E_2) a 18°C, prima e dopo l'aggiunta della soluzione di cloruro di ammonio, e Q il rapporto fra la concentrazione da determinare e la concentrazione della soluzione impiegata per l'aggiunta, C_x/C_s, la relazione fra ΔE e Q è la seguente:

$$E_1 = a + b \log C_x$$

$$E_2 = a + b \log\left(C_x \frac{V}{V+v} + C_s \frac{v}{V+v}\right)$$

$$\Delta E = b \log \frac{C_x}{C_x \frac{V}{V+v} + C_s \frac{v}{V+v}} = b \log \frac{Q}{Q \frac{V}{V+v} + \frac{v}{V+v}}$$

(*) Il potenziale viene misurato registrando il segnale fino alla stabilizzazione. La curva di stabilizzazione può essere utilizzata come criterio per la valutazione dell'integrità dell'elettrodo.

essendo a e b due grandezze caratteristiche dell'elettrodo, delle quali soltanto b, coefficiente angolare del tratto lineare del diagramma potenziale-logaritmo della concentrazione, deve essere noto (vedi 5.2) per applicare la suddetta equazione, ed essendo V il volume iniziale della soluzione da analizzare e v il volume aggiunto della soluzione a concentrazione C_s.

9. Qualità del dato

La riproducibilità è dell'ordine di ±4%; l'accuratezza varia tra il 3 ed il 7% nell'intervallo di concentrazione 1÷100 mg/L di $N\text{-}NH_3$.

METODO C - Determinazione spettrofotometrica mediante reattivo di Nessler o titrimetrica con acido solforico, previa distillazione

1. Principio del metodo

L'ammoniaca, essendo una base debole facilmente volatile, può essere separata quantitativamente da una soluzione acquosa mediante distillazione ad un pH intorno a 9,5.
Poiché le acque naturali hanno in genere differenti valori di pH e diverse proprietà tamponanti, al fine di mantenere il pH necessario durante il processo di distillazione, viene aggiunta al campione in esame una soluzione tampone di borato.
L'ammoniaca raccolta nel distillato, viene determinata per via spettrofotometrica con il reattivo di Nessler (metodo A2) o per titolazione con una soluzione di riferimento di un acido minerale forte, utilizzando un indicatore con viraggio intorno a pH 5.
Si raccomanda di raccogliere il distillato in una soluzione di acido borico quando la concentrazione di ammoniaca supera i 50 µg/L al fine di evitare eventuali perdite. Per un recupero totale è opportuno impiegare 50 mL di soluzione di acido borico per ogni mg di ammoniaca contenuto nel campione.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile nell'intervallo 0,04-5 mg/L se l'ammoniaca presente nel distillato viene determinata per via spettofotometrica mediante impiego del reattivo di Nessler; (7.4.1); nell'intervallo tra 5 e 100 mg/L è necessario ricorrere al dosaggio titrimetrico (7.4.2).

3. Interferenze e cause di errore

Glicina, urea, acido glutammico, cianati e acetammide si idrolizzano molto lentamente in soluzione; a pH=9,5 l'urea e i cianati si idrolizzano, rispettivamente, nella misura del 7 e del 5%.
Le ammine interferiscono anche nel dosaggio per titolazione, in quanto come sostanze alcaline possono reagire con la soluzione di acido.
I composti organici neutri non danno luogo ad alcuna interferenza nel metodo per titolazione.
L'H_2S, nel dosaggio colorimetrico, può produrre intorbidimento. Tale fenomeno può essere evitato aggiungendo nel pallone, prima della distillazione, del carbonato di piombo.
Alcune sostanze volatili interferenti, come la formaldeide, possono essere rimosse mediante ebollizione a basso pH prima di procedere alla distillazione del campione e al successivo trattamento con reattivo di Nessler.

4. Campionamento e conservazione del campione

Nel dosaggio dell'ammoniaca, i risultati più attendibili si ottengono sui campioni prelevati di

fresco, in quanto il contenuto di tale sostanza può variare rapidamente in seguito alla sua utilizzazione da parte dei consorzi batterici presenti nell'acqua.
Pertanto, nell'eventualità che non sia possibile effettuare subito il dosaggio, è opportuno aggiungere 0,8 mL di H_2SO_4 concentrato per litro di campione o comunque un volume tale da realizzare un pH compreso tra 1,5 e 2 e conservare il campione a 4°C al fine di bloccare l'attività biologica.
Se il campione è stato stabilizzato in ambiente acido, neutralizzare il campione aggiungendo NaOH o KOH immediatamente prima della determinazione.
Il cloro residuo eventualmente presente deve essere rimosso immediatamente dopo il prelievo, aggiungendo al campione una quantità equivalente di una soluzione riducente (6.9).

5. Apparecchiature

5.1 *Distillatore* comprendente un pallone della capacità di 1000÷1500 mL e un refrigerante. Tutto costruito in vetro Pyrex (Fig. 1).

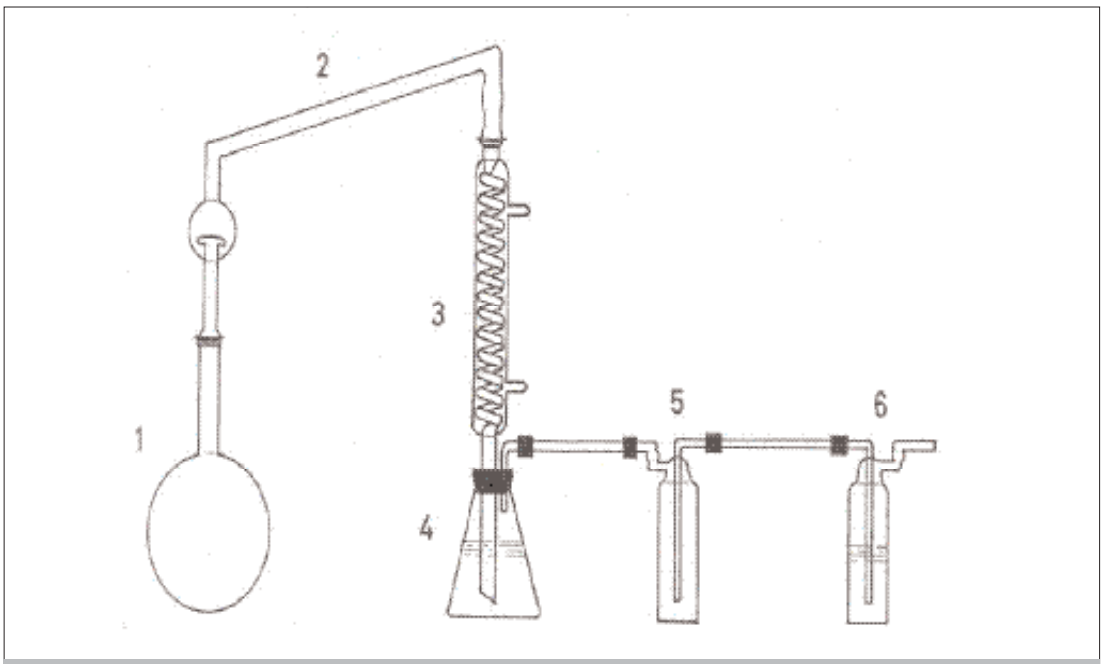


Figura 1: Apparecchiatura di distillazione dell'ammoniaca. 1 - Pallone da 1000÷1500 mL; 2 - Raccordo con bolla di Kjeldahl; 3 - Refrigerante; 4 - Beuta di raccolta del distillato; 5 - Bottiglia di Drechsel (funge da polmone contro i risucchi); 6 - Bottiglia di Drechsel (contiene una soluzione di acido solforico 1 N con metilarancio).

5.2 *Spettrofotometro* per misure nel campo del visibile dotato di celle da 1 cm.

6. Reattivi

È opportuno che tutte le soluzioni vengano preparate con prodotti puri per analisi e con acqua deionizzata ad elevato grado di purezza.

6.1 *Soluzione tampone di borato (pH 9,5)*

Sciogliere 9,5 g di tetraborato di sodio ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$) in 500 mL di acqua; aggiungere 88 mL di NaOH 0,1 M e diluire a 1 litro con acqua. È opportuno eseguire la determinazione del bianco della soluzione tampone.

6.2 Soluzione di acido borico con indicatore

Sciogliere 20 g di acido borico anidro (H_3BO_3) in acqua, aggiungere10 mL di soluzione di indicatore (6.7) e diluire a 1 litro.

6.3 Soluzione concentrata di cloruro d'ammonio (1 mL = 1 mg N-NH_3)

Sciogliere in acqua 3,819 g di cloruro d'ammonio anidro (NH_4Cl), seccato a 110°C, e diluire a 1 litro.

6.4 Soluzione diluita di cloruro d'ammonio (1 mL = 0,01 mg N-NH_3)

Diluire 10 mL di soluzione (6.3) a 1 litro con acqua.

6.5 Soluzione di NaOH 6 M

Sciogliere 24 g di NaOH in acqua e diluire a 100 mL.

6.6 Acido solforico 0,02 N

Preparare una soluzione di acido solforico 0,02 N per diluizione della soluzione 1 N (6.8.2) con acqua; determinarne quindi il titolo esatto con una soluzione di Na_2CO_3 (vedi metodo 2010 "Acidità ed alcalinità").

6.7 Indicatore misto rosso di metile-blu di metilene

Sciogliere 0,2 g di rosso metile in 100 mL di alcool etilico (95%). Sciogliere 0,1 g di blu di metilene in 50 mL alcool etilico (95%). Miscelare le due soluzioni.

6.8 Soluzioni neutralizzanti

6.8.1 Idrossido di sodio 1 M

Sciogliere 40 g di NaOH in acqua bidistillata e diluire a 1 litro.

6.8.2 Acido solforico 1 N

Aggiungere cautamente 28 mL di H_2SO_4 concentrato (d=1,84) a 500 mL di acqua e diluire a 1 litro.

6.9 Soluzione di tiosolfato di sodio (3,5 g/L)

Sciogliere 3,5 g di $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ in acqua e diluire a 1 litro.

6.10 Reattivo di Nessler

7. Procedimento

7.1 Preparazione dell'apparecchio distillatore

Una fonte d'inquinamento può essere costituita da vapori d'ammoniaca presenti nell'aria del laboratorio. In tal senso, si suggerisce di proteggere la beuta di raccolta del distillato dal contatto diretto dell'aria con una trappola ad acido solforico, come illustrato in Fig. 1.
Per eliminare tracce di ammoniaca nell'apparecchio di distillazione, introdurre nel pallone 500 mL di acqua deionizzata e 20 mL di soluzione tampone di borato; aggiustare il pH a 9,5

con NaOH 6 M (6.5) e distillare fino a quando un saggio eseguito su 10 mL di distillato non dia più alcuna reazione con il reattivo di Nessler.

7.2 Preparazione del campione

Dopo il lavaggio del distillatore introdurre nel pallone 500 mL del campione di acqua, o un'aliquota diluita a 500 mL con acqua deionizzata. Per contenuti di ammoniaca inferiori a 0,05 mg/L è opportuno impiegare volumi maggiori di acqua (750/1000 mL).
Rimuovere il cloro residuo, eventualmente presente nel campione, mediante addizione di una quantità equivalente di soluzione ad azione declorante. Utilizzare 1 mL di soluzione di tiosolfato di sodio (6.9) per rimuovere 1 mg/L di cloro residuo in 500 mL di campione. Se necessario, neutralizzare il campione in esame a pH 7 con acido (6.8.2) o base (6.8.1), quindi aggiungere 25 mL di soluzione tampone di borato (6.1) e aggiustare il pH a 9,5 con NaOH 6 M (6.5) utilizzando un pHmetro.

7.3 Distillazione

Dopo il lavaggio dell'apparecchio distillatore si deve evitare qualsiasi possibilità d'inquinamento. Svuotare il pallone avendo cura di lasciarvi le palline di vetro. Quindi introdurre nel distillatore il campione di acqua, preparato secondo le modalità descritte in 7.2, e procedere alla distillazione ad una velocità di 6-10 mL/minuto, raccogliendo il distillato (almeno 200 mL) in una beuta contenente 50 mL di soluzione di acido borico (6.2). Lavare il refrigerante con un piccolo volume (5÷10 mL) di acqua da unire al distillato. Diluire a 500 mL con acqua.

7.4 Determinazione

La determinazione può essere effettuata sia per via spettrofotometrica che per via titrimetrica.

7.4.1 Dosaggio spettrofotometrico

Prelevare 50 mL di soluzione proveniente dal trattamento 7.3, oppure un'aliquota diluita a 50 mL con acqua, aggiungere la soluzione stabilizzante (1 goccia di reattivo EDTA o 2 gocce di soluzione di sale di Seignette) e miscelare bene.
Aggiungere 2 mL di reattivo di Nessler (se si è utilizzata la soluzione di EDTA) o 1 mL (se si è utilizzata la soluzione di sale di Seignette), miscelare bene, attendere 15 minuti e misurare l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 420 nm.

7.4.2 Dosaggio titrimetrico

Prelevare 50 mL di soluzione proveniente dal trattamento 7.3, oppure un'aliquota diluita a 50 mL con acqua, aggiungere tre gocce dell'indicatore misto rosso di metile-blu di metilene e titolare l'ammoniaca con una soluzione titolata di H_2SO_4 0,02 N fino al viraggio dell'indicatore.
Determinare il bianco su uno stesso volume di acqua deionizzata e di soluzione di acido borico impiegati nel processo di distillazione al fine di apportare le dovute correzioni.

8. Calcoli

8.1 Dosaggio spettrofotometrico

Dal valore dell'assorbanza, corretto del valore del bianco, risalire alla concentrazione di azoto ammoniacale utilizzando una curva di taratura costruita secondo le modalità indicate al Paragrafo 7.1 del metodo A2. Nel caso sia stata eseguita una diluizione del campione, moltiplicare il risultato per il fattore di diluizione.

8.2 Dosaggio titrimetrico

L'ammoniaca presente nel campione può essere calcolata nel modo seguente:

$$NH_4^+ (mg/L) = \frac{(a-b) \cdot N \cdot 18 \cdot 1000}{V}$$

dove:
a = mL di H_2SO_4 utilizzati per il campione;
b = mL di H_2SO_4 utilizzati per il bianco;
V = mL di campione di acqua posti a distillare;
N = normalità dell'H_2SO_4 (6.6);
18 = peso equivalente di NH_4^+.

L'azoto ammoniacale N-NH_4^+si ricava con la seguente formula:

$$N - NH_4^+ = NH_4^+ \cdot 0,78$$

9. Qualità del dato

In uno studio pubblicato dall'EPA, relativo alla determinazione, da parte di 16 laboratori, di N-NH_4^+ in campioni di acque naturali, a cui sono state aggiunte concentrazioni note di un sale d'ammonio, vengono riportati i seguenti valori di precisione e accuratezza:

N-NH_4^+ aggiunta (mg/L)	Precisione espressa come CV (%)	Accuratezza (%)
0,21	58,1	-5,54
0,26	26,9	-18,12
1,71	3,84	+0,46
1,92	14,5	-2,01

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA), 4-104/4-108.

ASTM (1989): "*Book of Standards*", Section 11-Water and environmental technology, **11**, 01, 257-263.

BOOTH R.L. & THOMAS, R.F. (1973): "Selective electrode measurements of ammonia in water and wastes", *Environ. Sci. Technol.*, **7**, 523.

CEBEDEAU (1966): "*Libre de l'eau*", Vol. **2**, CEBEDOC (Liegi).

EPA (1979): "*Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes*", Method 350.2, EPA-600/4-79-020, Environmental Monitoring and Support, Cincinnati OH 45268.

FRESENIUS W., QUENTIN K.E. & SCHNEIDER W. (Eds.) (1988): "*Water Analysis*", Springer-Verlag, Berlin, 804 pp.

GILBERT T.R. & CLAY A.M. (1973): "Determination of ammonia in aquaria and in sea using the ammonia electrode", *Anal. Chem.*, **45**, 1757.

GRASSHOFF K. & JOHANNSEN H. (1972): "A new sensitive and direct method for the determination of ammonia in sea water", *J.Cons. Perm. Int. Explor. Mer.*, **34,** 516-521.

HAMPSON B.L. (1977): "The analysis of ammonia in polluted seawater", *Wat. Res.*, **11**, 305.

MIDGLEY D. & TORRANCE K. (1972): "Determination of ammonia in condensed steam and boiler feed water with a potentiometric ammonia probe", *Analyst*, **97**, 626.

REUSCH BERG B. & ABDULLAH M.I. (1977): "An automatic method for the determination of ammonia in seawater", *Wat. Res.*, **11**, 637.

TARTARI G.A. & MOSELLO. R. (1997): "Metodologie analitiche e controlli di qualità nel laboratorio chimico dell'Istituto Italiano di Idrobiologia del Consiglio Nazionale delle Ricerche", *Documenta Ist. Ital. Idrobiol.*, **60**, 160 pp.

TETLOW J.A. & WILSON A.L. (1964): "An absorption method for determining ammonia in boiler feed-water", *Analyst*, **89**, 453.

WAGNER E.C. (1940): "Titration of ammonia in the presence of acid boric", *Ind. Eng. Chem.*, Anal. Ed., **12**, 711.

4040. Azoto nitrico

I nitrati rappresentano l'ultimo stadio di ossidazione dei composti azotati provenienti dai processi di decomposizione biologica di sostanze organiche.
Possono essere presenti in tracce nelle acque superficiali e negli scarichi domestici "freschi", mentre possono raggiungere concentrazioni significative nelle acque sotterranee.
Gli effluenti di impianti di trattamento possono contenere fino a 50 mg/L di azoto nitrico in relazione al contenuto di azoto totale e alle condizioni e temperatura degli scarichi; raramente si trovano, invece, negli scarichi in ingresso agli impianti (influenti) in quanto costituiscono una fonte di ossigeno per gli scarichi biologicamente instabili.

METODO A1 - Determinazione spettrofotometrica mediante salicilato di sodio

1. Principio del metodo

Il metodo si basa sulla reazione tra i nitrati e il salicilato di sodio in soluzione acida per acido solforico.
Il composto ottenuto ha, in soluzione alcalina, un colore giallo stabile misurabile spettrofotometricamente alla lunghezza d'onda di 420 nm.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile alle acque naturali, alle acque trattate ed agli scarichi domestici ed industriali nell'intervallo di concentrazione da 0,5 a 5,0 mg/L di azoto nitrico.

3. Interferenze e cause di errore

Se il campione è torbido, ad un'aliquota di campione aggiungere qualche pastiglia di idrossido di sodio per portare il pH a circa 8,5; agitare dopo aver aggiunto 0,5 g di carbone attivo, filtrare ed eseguire sul filtrato il dosaggio dell'azoto nitrico secondo il procedimento descritto in (7.1).
Se sono presenti sostanze colorate, a 50 mL di campione aggiungere 1 g di carbone attivo (6.9) ed agitare energicamente per 5 minuti. Filtrare e sul filtrato eseguire il dosaggio dell'azoto nitrico applicando il procedimento descritto in (7.1).
Se è presente sostanza organica a basse concentrazioni (per esempio BOD_5=25 mg/L; COD=110 mg/L e TOC=40 mg/L) i risultati non dipendono dal pretrattamento con carbone attivo. Il metodo fornisce valori in leggero difetto rispetto al metodo UV e a quello che utilizza la colonna di cadmio.
I cloruri non interferiscono fino ad una concentrazione di 400 mg/L. Se la concentrazione di cloruri è più alta si ha una interferenza negativa. In questo caso, dopo aver determinato a parte il contenuto di cloruri nell'acqua in esame, trattare 100 mL di campione con una quantità equivalente di soluzione di solfato di argento (6.8); lasciare coagulare il cloruro di argento e, se necessario, favorirne la coagulazione con un leggero riscaldamento.
Eliminare il precipitato per filtrazione o centrifugazione ed eseguire il dosaggio dell'azoto nitrico nella fase liquida applicando il procedimento descritto in (7.1), tenendo conto della diluizione durante le operazioni di calcolo.

Il ferro interferisce per concentrazioni superiori a 5 mg/L; in questo caso agitare una quantità definita di campione con ossido di zinco (6.7) e filtrare. Sul filtrato limpido eseguire il dosaggio dell'azoto nitrico secondo il procedimento descritto in (7.1).
I nitriti interferiscono positivamente per concentrazioni superiori a 2 mg/L; in questo caso aggiungere al campione prelevato per l'analisi, prima dell'evaporazione a secco, 0,05 g di solfato di ammonio (6.6).

4. Campionamento e conservazione del campione

Il prelievo e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".

5. Apparecchiature

5.1 *Spettrofotometro* per misure a 420 nm, munito di celle aventi cammino ottico di 1cm.

5.2 *Vetreria normale di laboratorio*

5.3 *Capsule di porcellana da 60 mL*

6. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi. L'acqua indicata nel metodo deve essere distillata o deionizzata.

6.1 *Soluzione di salicilato di sodio*

Sciogliere 0,5 g di salicilato di sodio e portare a 100 mL con acqua. La soluzione va preparata al momento dell'uso.

6.2 *Soluzione di tartrato di sodio e potassio (Sale di Seignette) e di idrossido di sodio*

Sciogliere 400 g di NaOH e 60 g di tartrato di sodio e potassio ($NaKC_4H_4O_6 \cdot 4H_2O$), raffreddare e portare a 1000 mL con acqua. La soluzione va conservata in contenitore di polietilene.

6.3 *Acido solforico concentrato al 96% (d=1,84)*

6.4 *Soluzione di idrossido di sodio 1 M*

Sciogliere 40 g di NaOH e portare a 1000 mL con acqua in matraccio tarato.

6.5 *Soluzione di idrossido di sodio 0,1 M*

Introdurre 10 mL della soluzione di NaOH 1 M (6.4) in matraccio tarato da 100 mL e portare a volume con acqua.

6.6 *Solfato di ammonio, $(NH_4)_2SO_4$*

6.7 *Ossido di zinco (ZnO)*

6.8 Soluzione di solfato di argento

Sciogliere 4,4 g di solfato di argento (Ag_2SO_4) e portare a 1000 mL con acqua in matraccio tarato (1 mL di questa soluzione corrisponde ad 1 mg di Cl^-).

6.9 Carbone attivo

6.10 Soluzione di concentrata di nitrato di potassio (0,1 mg N/mL)

Sciogliere 0,722 g di nitrato di potassio anidro (KNO_3), aggiungere 1 mL di cloroformio e portare a 1000 mL con acqua in matraccio tarato.

6.11 Soluzione diluita di nitrato di potassio (0,005 mg N/mL)

Introdurre 25 mL della soluzione concentrata di nitrato di potassio (6.10) in matraccio tarato da 500 mL e portare a volume con acqua distillata.

7. Procedimento

7.1. Taratura

La taratura va effettuata all'inizio di ogni ciclo di analisi.
Prelevare, ad esempio, 1 mL; 2 mL; 5 mL e 10 mL di soluzione diluita di azoto nitrico (6.11) corrispondenti rispettivamente a 5 µg; 10 µg; 25 µg e 50 µg di azoto nitrico ed introdurli in capsule di porcellana da 60 mL; portare al volume di 10 mL con acqua. Preparare inoltre un bianco con 10 mL di acqua deionizzata. Aggiungere alle soluzioni di taratura e al bianco 1 mL di soluzione di salicilato di sodio (6.1) ed evaporare a secco su bagno ad acqua bollente.
Lasciare raffreddare e riprendere il residuo con 2 mL di H_2SO_4 concentrato (6.3), inclinando e ruotando la capsula in modo da inumidire completamente il residuo.
Lasciare a riposo 10 minuti, aggiungere 15 mL di acqua e poi 15 mL di soluzione di idrossido di sodio e tartrato di sodio e potassio (6.2) che provoca lo sviluppo della colorazione gialla, stabile almeno 1 ora.
Miscelare bene il tutto con una bacchetta di vetro ed effettuare le letture alla lunghezza d'onda di 420 nm, utilizzando celle da 1 cm di cammino ottico.
Tracciare la curva di taratura ponendo in ascisse le quantità di N-nitrico in µg ed in ordinate i corrispondenti valori di assorbanza.

7.2 Determinazione

Portare il campione di acqua, incolore, a pH 7 circa. Introdurre 10 mL, od un volume minore «V» diluito a 10 mL con acqua, in capsula di porcellana da 60 mL.
Alcalinizzare debolmente con una goccia di soluzione di NaOH 0,1 M (6.5) e procedere come descritto al Paragrafo 7.1.

8. Calcoli

Dal valore di assorbanza rilevato sul campione, utilizzando la retta di taratura, risalire alla concentrazione di N-nitrico nel campione di acqua in esame mediante la seguente espressione:

$$\text{N–nitrico (mg/L)} = \frac{a}{V}$$

dove:
a = quantità (µg) di azoto nitrico ricavata dalla curva di taratura;
V = volume (mL) di campione utilizzato per l'analisi.

9. Qualità del dato

Prove effettuate (n=5) da cinque laboratori su campioni reali hanno fornito valori del coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100, inferiori al 5%, in accordo con i valori riportati in letteratura. Su campioni di acque sotterranee i recuperi sono stati del 100%; recuperi più bassi, compresi tra l'80 e il 90%, sono stati ottenuti su campioni di acque superficiali.

METODO A2 - Determinazione spettrofotometrica mediante solfanilammide e α-naftiletilendiammina

1. Principio del metodo

Il nitrato viene ridotto a nitrito in modo pressochè quantitativo (90-95%) facendo percolare l'acqua da analizzare attraverso una colonna di cadmio metallico ramato ad un pH iniziale di circa 5,5. Successivamente si misura per via spettrofotometrica, a 543 nm, l'assorbanza del prodotto colorato che si ottiene a pH 1,5-2 dalla diazotazione con solfanilammide dell'acido nitroso formatosi e dalla successiva copulazione con N-(1-naftil)-etilendiammina.
Il dosaggio fornisce la concentrazione del nitrato ridotto più quella del nitrito eventualmente già presente; per ottenere quindi la concentrazione del solo «azoto nitrico» occorre sottrarre la concentrazione dell'«azoto nitroso», dosando quest'ultimo in un altro campione di acqua non sottoposto al processo di riduzione.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile alle acque naturali (dolci, salmastre e marine) e alle acque di scarico previo pretrattamento del campione (vedi Capitolo 3). In dette acque la concentrazione dell'azoto nitroso si può spesso trascurare rispetto a quello dell'azoto nitrico.
Eseguendo il dosaggio su 100 mL di campione e 50 mL del percolato, il metodo può essere impiegato tra 0,002 e 0,02 mg/L di N, usando vaschette con un cammino ottico pari a 10 cm, e tra 0,02 e 0,2 mg/L di N usando vaschette con cammino ottico pari a 1 cm. Per concentrazioni di «azoto nitrico+nitroso» più elevate, analizzare un campione di acqua opportunamente diluito.

3. Interferenze e cause di errore

Il metodo, applicato all'analisi di acque naturali, non è affetto da interferenze significative.
Nel caso di acque di scarico interferiscono materiali sospesi, ferro, rame ed altri metalli, cloro residuo oltre a oli e grassi.
Le interferenze dovute ai solidi sospesi possono essere eliminate variando le dimensioni della colonna, quelle dovute ai metalli mediante aggiunta di EDTA al campione. L'interferenza di oli e grassi può essere eliminata sottoponendo il campione ad un'estrazione con solvente organico. Il cloro residuo viene rimosso per aggiunta di tiosolfato sodico.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il prelievo e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".
Comunque si precisa che, se non è possibile effettuare l'analisi entro alcune ore dal prelievo mantenendo i campioni a 4°C e al riparo dalla luce, i campioni devono essere conservati a −20°C usando contenitori di polietilene o di polipropilene.

5. Apparecchiature

5.1 Colonne in vetro per la riduzione del nitrato (Fig. 1)

5.2 Spettrofotometro per misure nel campo del visibile, munito di celle aventi cammino ottico di 1-10 cm.

5.3 Normale vetreria di laboratorio

La vetreria deve essere ben sgrassata e lavata con acido cloridrico e poi con acqua.

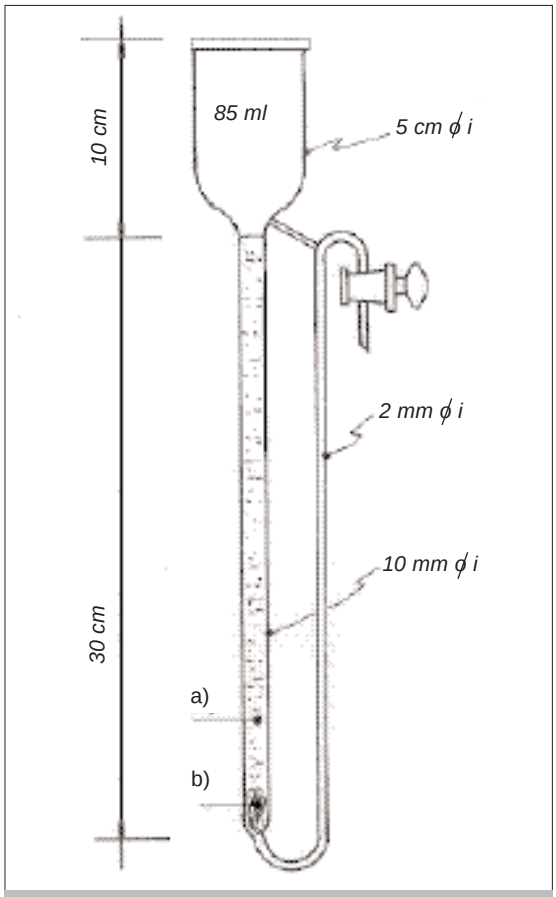


Figura 1: Colonna in vetro per la riduzione del nitrato. a = cadmio ramato; b = fili di rame o lana di vetro.

6. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e l'acqua, indicata nel metodo, deve essere bidistillata o distillata e deionizzata.

6.1 Cadmio metallico granulare (purezza minima 99,9%) con granuli di diametro compreso tra 0,5 e 2 mm.

6.2 Soluzione di solfato di rame al 2% (m/V)

Sciogliere 20 g di solfato di rame pentaidrato ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) e diluire a 1000 mL con acqua.

6.3 Soluzione concentrata di cloruro di ammonio al 25% (m/V)

Sciogliere 125 g di cloruro di ammonio (NH_4Cl) e diluire a 500 mL con acqua.

6.4 Soluzione diluita di cloruro di ammonio allo 0,625% (m/V)

Diluire 50 mL della soluzione (6.3) a 2 litri con acqua.

6.5 Soluzione di solfanilammide (SA) all'1% (m/V)

Sciogliere, subito dopo la pesata, 1 g di solfanilammide ($C_6H_8N_2O_2S$, p-amminobenzensolfonammide) in una soluzione formata da 10 mL di acido cloridrico (6.11) e 70 mL di acqua e diluire a 100 mL sempre con acqua.
Il prodotto solido può alterarsi all'aria e alla luce. La soluzione, conservata in bottiglia scura, è stabile per molti mesi.

6.6 Soluzione di naftiletilendiammina (NEDA) allo 0,1% (m/V)

Sciogliere 0,1 g di dicloridrato di N-(1-naftil)-etilendiammina ($C_{12}H_{14}N_2 \cdot 2HCl$) in 100 mL di acqua e conservare in bottiglia scura. Rinnovare la soluzione ogni mese e comunque quando assume una colorazione bruna.

6.7 Soluzione concentrata di N-NO_3 (140 mg/L)

Pesare 1,011 g di nitrato di potassio anidro (KNO_3) e secco; sciogliere in acqua e diluire esattamente a 1 litro in matraccio tarato.
Questa soluzione è stabile per almeno sei mesi.

6.8 Soluzione diluita di N-NO_3 (0,14 mg/L)

Introdurre 1,00 mL di soluzione concentrata di N-NO_3 (6.7) in un matraccio tarato da 1 litro e diluire a volume con acqua di mare (6.9) nel caso di analisi di acque marine oppure con acqua nel caso di analisi di acque dolci. La soluzione va preparata immediatamente prima dell'uso.

6.9 Acqua di mare di diluizione

L'acqua di mare di diluizione può essere preparata per via sintetica oppure impiegando acqua di mare naturale. L'importante è che in entrambi i casi il contenuto di nitrato e nitrito sia molto basso.

6.9.1 Acqua di mare sintetica

Sciogliere 310 g di cloruro di sodio (NaCl), 100 g di solfato di magnesio eptaidrato ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) e 0,5 g di idrogenocarbonato di sodio monoidrato ($NaHCO_3 \cdot H_2O$) in 10 litri di acqua.

6.9.2 Acqua di mare naturale

Acqua di mare naturale a bassissimo contenuto di nitrato+nitrito come, ad esempio, l'acqua superficiale prelevata in mare aperto al largo della costa nel periodo estivo eventualmente invecchiata per un tempo opportuno, e filtrata attraverso un filtro da 0,45 µm.

6.10 Acetone (C_3H_6O)

6.11 Soluzione di acido cloridrico concentrato (HCl) (d=1,18)

6.12 Soluzione di acido cloridrico 2 M

Diluire 167 mL di acido cloridrico concentrato (6.11) a 1 litro con acqua.

7. Procedimento

7.1 Preparazione della colonna di riduzione

Il cadmio granulare impiegato è la frazione che passa attraverso un setaccio con maglie da 2 mm ed è trattenuta da un setaccio con maglie da 0,5 mm. 110 g di cadmio setacciato vengono preliminarmente sgrassati più volte con porzioni fresche di acetone (6.10) e poi lavati con HCl 2 M (6.12) e con acqua fino a che il pH dei lavaggi è maggiore di 5. Successivamente i granuli vengono trattati, sotto agitazione, con 500 mL di soluzione al 2% di solfato di rame (6.2) fino a scomparsa del colore azzurro e comparsa di un precipitato colloidale bruno. Decantare la soluzione e lavare infine i granuli ramati con acqua (almeno dieci volte) per asportare tutto il precipitato di rame colloidale. Con tale quantità si possono preparare tre colonne delle dimensioni indicate in Fig. 1, riempiendole con la soluzione di cloruro di ammonio diluito (6.4) e versandovi il cadmio ramato, un poco per volta in modo che sedimenti bene, dopo aver inserito sul fondo un batuffolo di lana di vetro o meglio di rame in fili molto fini.

Lavare con 200 mL della soluzione diluita di cloruro d'ammonio (6.4), facendo defluire 8-12 mL al minuto.
Le colonne non in uso vanno mantenute piene di soluzione diluita di cloruro d'ammonio (6.4) e riposte al buio o ricoperte con foglio di alluminio per evitare l'esposizione del cadmio ramato alla luce.
Prima dell'uso lavare abbondantemente la colonna facendo defluire acqua distillata.

7.2 Controllo dell'efficienza della colonna di riduzione

Controllare l'efficienza della colonna facendo percolare una soluzione di nitrato in acqua (6.8) secondo le modalità indicate al Paragrafo 7.3.
Dalla concentrazione C in mg/L della soluzione percolata (0,14 mg/L) e dall'assorbanza corretta del valore del bianco dei reagenti (A_C), per 1 cm di cammino ottico si ricava un fattore F dalla relazione:

$$F = \frac{C}{A_c}$$

dove Ac rappresenta «l'assorbanza corretta media» delle 2 o 3 repliche eseguite.
Il fattore F dovrebbe avere un valore vicino a 0,31 per un'efficienza del 100%; un fattore intorno a 0,37, corrispondente a circa 84%, è comunque ritenuto adeguato. Poichè la colonna si disattiva in caso di prolungato impiego o, al contrario, di non utilizzo per un lungo periodo tempo, la sua efficienza deve essere misurata almeno all'inizio e alla fine di ciascun giorno di lavoro. Una colonna preparata di fresco può ridurre circa il 15% del nitrato a stati di ossidazione più bassi del nitrito. Si consiglia pertanto di far passare 2 litri circa di una soluzione 0,85 mg/L di $N\text{-}NO_3$ e 50 mL di soluzione concentrata di NH_4Cl (6.3). Il controllo dell'eventuale eccessiva riduzione a stati di ossidazione più bassi del nitrito può essere effettuato facendo percolare attraverso la colonna una soluzione a titolo noto di $N\text{-}NO_2$ nelle stesse condizioni e quantità indicate al Paragrafo 7.3 per la taratura.
Qualora l'efficienza della colonna scenda al di sotto dell'80% procedere alla sua riattivazione nel modo seguente:
estrarre il cadmio ramato dalla colonna e lavarlo con acido cloridrico 2 M (6.12) (80-100 mL) agitando vigorosamente; lavare con acqua per eliminare l'acido e ripetere il trattamento acido ancora una volta. Lavare quindi ripetutamente con piccole porzioni di acqua distillata fino ad ottenere il valore di pH 5 nelle acque di lavaggio; decantare bene il supernatante fino a lasciare la polvere quasi asciutta e ripetere il trattamento con soluzione al 2% di solfato di rame (6.2).

7.3 Taratura

Poichè in questo metodo vi è un piccolo effetto sale, la taratura andrebbe fatta usando un'acqua a forza ionica simile a quella dell'acqua da analizzare; nel caso dell'acqua di mare si deve utilizzare l'acqua di diluizione (6.9).
Preparare soluzioni di riferimento trasferendo volumi opportuni della soluzione concentrata di nitrato (6.7) in matracci tarati da 100 mL e portando a volume con acqua. Aggiungere nei matracci 2 mL di soluzione concentrata di NH_4Cl e far percolare attraverso la colonna di riduzione, ad un flusso di 8-12 mL/min, 5 mL di queste soluzioni, che vengono scartati.
Riempire il serbatoio con altri 40 mL, che vengono a loro volta fatti passare in colonna e scartati. Far passare quindi il rimanente volume di soluzione in colonna (8-12 mL/min) e raccogliere 50 mL in pallone tarato. Aggiungere 1 mL di soluzione di SA (6.5) e miscelare; dopo 2-3 minuti aggiungere 1 mL di soluzione di NEDA (6.6). Miscelare bene e dopo 10-15 minuti misurare l'assorbanza delle soluzioni a 543 nm utilizzando celle con cammino ottico di 1 cm.
L'assorbanza di 100 mL di acqua deionizzata o di mare, sottoposta all'intera procedura impiegata per le soluzioni di riferimento fornisce il bianco dei reattivi.

7.4 Dosaggio del campione

Prelevare 100 mL di campione, eventualmente filtrati attraverso un filtro da 0,45 µm, o un'aliquota diluita a 100 mL con acqua deionizzata o di mare; aggiungere poi 2 mL di soluzione concentrata di NH_4Cl (6.3): il pH deve essere circa 5,5. Procedere quindi come per la taratura (7.3) utilizzando celle con cammino ottico opportuno.

8. Calcoli

Dal valore dell'assorbanza, corretto del valore del bianco dei reattivi, risalire alla concentrazione di azoto nitrico+nitroso ($N\text{-}NO_3$+$N\text{-}NO_2$) utilizzando la curva di taratura.
Nel caso sia stata eseguita una diluizione del campione, moltiplicare per il fattore di diluizione.
Ricavare la concentrazione di azoto nitrico, sottraendo la concentrazione di azoto nitroso ottenuta dosando quest'ultimo in un altro campione di acqua non sottoposto al processo di riduzione (Sezione 4050).

9. Qualità del dato

Prove effettuate (n=7) da sei laboratori su acque di scarico a concentrazioni di $N\text{-}NO_3$+$N\text{-}NO_2$ comprese tra 0,04 e 0,2 mg/L hanno fornito valori del coefficiente di variazione, CV (%)= (scarto tipo/valore medio)·100, inferiori al 12% e recuperi intorno al 100%.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed. (Washington, APHA), 4-117/4-118.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (1975): "*Manual of Methods in Aquatic Environment Research*", FAO Fisheries Technical Paper N. 137, Roma, 156-161.

IRSA (1986): "Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **75**, 485-488.

NYDAHL F. (1976): "On the optimum conditions for the reduction of nitrate by cadmium", *Talanta*, **23**, 349.

RODIER J. (1975): "*L'analyse de l'Eau: eaux naturelles, eaux residuaires, eau de mer*", 5° ed. (Dunod, Paris).

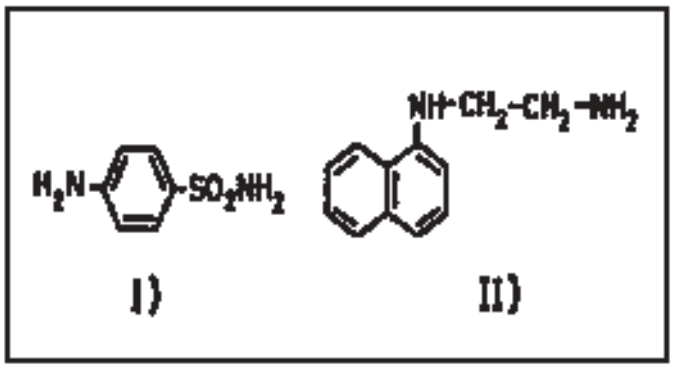
STRICKLAND J.D.H. & PARSONS T.R. (1968): "*A practical handbook of seawater analysis*", Fisheries Research Board of Canada Bulletin, **167**, 71.

4050. Azoto nitroso

I nitriti (azoto nitroso) rappresentano uno stadio intermedio nel ciclo dell'azoto. Generalmente si originano dall'ossidazione dell'ammoniaca proveniente da processi di biodegradazione di sostanze proteiche; più raramente possono derivare da processi di riduzione di nitrati. Poiché i nitriti sono trasformati facilmente e rapidamente in nitrati, la loro presenza, anche in tracce, è indizio di processo biologico in atto nell'acqua. Inoltre, i nitriti possono essere veicolati nelle acque superficiali da scarichi di particolari industrie in cui vengono impiegati come inibitori di fenomeni di corrosione.

1. Principio del metodo

A pH 2,0-2,5 la solfanilammide (I) viene diazotata dall'acido nitroso ed il diazocomposto che ne risulta viene copulato con la N-(1-naftil)-etilendiammina (II); si ottiene così un azocomposto di colore rosso porpora la cui assorbanza viene misurata a 543 nm.



2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile alle acque naturali, acqua di mare compresa, ed a quelle di scarico nell'intervallo 0,001-0,2 mg/L di $N\text{-}NO_2$, utilizzando celle di cammino ottico opportuno (1-10 cm). Concentrazioni di azoto nitroso più elevate possono essere determinate dopo appropriata diluizione del campione.

3. Interferenze e cause di errore

Il metodo non è influenzato dalla salinità e da variazioni limitate della temperatura (15÷30°C).
Interferiscono, tra le sostanze organiche, il tricloruro di azoto, l'urea e le ammine; tra quelle inorganiche interferiscono: il rame (II) se presente in concentrazione superiore a 0,5 mg/L, in quanto catalizza la decomposizione del sale di diazonio provocando risultati in difetto; lo ione ioduro se presente in concentrazione superiore a 0,1 mg/L; ed infine i forti agenti ossidanti e riducenti.

Sb^{3+}, As^{3+}, Bi^{3+}, Fe^{3+}, Pb^{2+}, Hg^{2+}, Ag^{+}, $PtCl_6^{2-}$, VO_3^{2-} possono interferire nelle condizioni del saggio in quanto precipitano, pertanto dovrebbero risultare assenti.
Un'alcalinità dell'acqua maggiore di 600 mg/L come $CaCO_3$ interferisce perchè non consente, con le quantità dei reattivi indicate, di ottenere il pH richiesto. La preventiva neutralizzazione dell'acqua in esame può ovviare a questo inconveniente.
Nel caso di campioni torbidi (come tali o che lo diventino durante l'analisi per la presenza di metalli o specie metalliche che al pH di reazione danno luogo alla formazione di precipitati) e nel caso di campioni colorati che assorbano alla lunghezza d'onda di misura, si deve operare come indicato al Paragrafo 7.2.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il prelievo e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". In particolare, si consiglia di analizzare il campione il più presto possibile, allo scopo di prevenire una eventuale trasformazione dei nitriti a nitrati o ammoniaca ad opera di batteri presenti nell'acqua.
È consigliabile evitare l'aggiunta di conservanti che potrebbero creare problemi di interferenze. Inoltre le bottiglie vanno riempite completamente senza lasciare aria tra l'acqua ed il tappo e conservate al riparo dalla luce e dal calore.

5. Apparecchiature

5.1 *Spettrofotometro* per il visibile munito di celle aventi cammino ottico di 1-10 cm.

5.2 *Normale vetreria di laboratorio*

Tra i vari sistemi proponibili per il lavaggio della vetreria risulta conveniente quello che impiega acido cloridrico. Comunque, qualunque sia la soluzione di lavaggio adottata, è necessario successivamente sciacquare abbondantemente con acqua deionizzata.

6. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere di grado analitico e l'acqua usata deve essere deionizzata ad elevato grado di purezza.

6.1 *Soluzione di solfanilammide (SA) all'1% (m/V)*

Sciogliere, subito dopo la pesata, 1 g di solfanilammide ($C_6H_8N_2O_2S$, p-amminobenzensolfonammide) in una soluzione formata da 10 mL di acido cloridrico (6.4) e 70 mL di acqua e diluire a 100 mL sempre con acqua.
Il prodotto solido può alterarsi all'aria e alla luce. La soluzione, conservata in bottiglia scura, è stabile per molti mesi.

6.2 *Soluzione di naftiletilendiammina (NEDA) allo 0,1% (m/V)*

Sciogliere 0,1 g di dicloridrato di N-(1-naftil)-etilendiammina ($C_{12}H_{14}N_2 \cdot 2HCl$) in 100 mL di acqua e conservare in bottiglia scura. Rinnovare la soluzione ogni mese e comunque quando assume una colorazione bruna.

6.3 *Soluzione concentrata di N-N0$_2$ (1 mL = 0,25 mg/L di N-N0$_2$)*

Il prodotto solido va conservato al riparo dell'aria e dell'umidità perché può ossidarsi. Pesare 1,232 g di nitrito di sodio anidro ($NaNO_2$) seccato a 110°C per un'ora; sciogliere con ac-

qua e diluire esattamente a 1 litro con acqua in matraccio tarato. Conservata al buio con l'aggiunta di 1 mL di cloroformio la soluzione è stabile per almeno un mese.
Il titolo della soluzione (6.3) può essere controllato nel modo seguente:
Introdurre in una beuta a tappo smerigliato 50 mL di una soluzione a titolo noto di permanganato di potassio ($KMnO_4$) 0,05 N, aggiungere 5 mL di acido solforico concentrato e 50 mL della soluzione di nitrito immergendo la punta della pipetta a doppia tacca o della buretta nella soluzione acida di permanganato.
Chiudere la beuta, agitare e scaldare a 70÷80°C. Decolorare la soluzione con 50 mL di soluzione a titolo noto di ossalato di sodio 0,05 N ($Na_2C_2O_4$, standard primario secco, 3,350 g/L). Titolare l'eccesso di ossalato con la soluzione di $KMnO_4$ 0,05 N fino a lieve colorazione rosa. Calcolare la concentrazione della soluzione 6.3 nel modo seguente:

$$C(mg/L) = \frac{[(V_a+V_b)N_1 - (V_c N_2)]\cdot 7\cdot 1000}{V_n}$$

dove:
V_a = mL di soluzione a titolo noto di permanganato prelevati;
V_b = mL di soluzione di nitrito aggiunti;
V_c = mL di soluzione a titolo noto di ossalato di sodio aggiunti;
V_d = mL di soluzione di permanganato a titolo noto impiegati nella titolazione;
N_1 e N_2 = normalità del permanganato e dell'ossalato rispettivamente;
7 = è il peso equivalente dell'azoto nitroso.

Ogni mL di $KMnO_4$ 0,05 N consumato dalla soluzione di nitrito corrisponde a 0,35 mg di $N\text{-}NO_2$.

6.4 Soluzione di acido cloridrico concentrato (HCl) (d=1,18)

7. Procedimento

7.1 Taratura

Preparare le soluzioni di taratura nel campo di applicabilità del metodo, prelevando volumi opportuni della soluzione (6.3) e portando a volume a 50 mL.
Aggiungere 1 mL di soluzione di SA (6.1) e, dopo 2÷3 minuti, 1 mL di soluzione di NEDA (6.2). Lasciar sviluppare il colore per 15 minuti e misurare l'assorbanza a 543 nm.
Riportare in grafico le assorbanze corrette per il bianco dei reattivi (BR) in funzione delle corrispondenti concentrazioni di $N\text{-}NO_2$.

7.2 Dosaggio del campione

Aggiungere a 50 mL di campione, preventivamente filtrato attraverso un filtro da 0,45 µm e portato ad un pH intorno alla neutralità con volumi noti di soluzioni di acido cloridrico o di idrossido di sodio 1 M, o ad una sua aliquota diluita a 50 mL con acqua, 1 mL di soluzione di SA (6.1) e, dopo 2÷3 minuti, 1 mL di soluzione di NEDA (6.2). Lasciar sviluppare il colore per 15 minuti e misurare l'assorbanza (A_m) a 543 nm.
Se dopo la filtrazione permane una torbidità e/o un colore con un'assorbanza non eccessiva a 543 nm e/o se dopo l'aggiunta dei reattivi si ha una modesta torbidità si può fare un «bianco dell'acqua in esame non trattata» (BA), misurando l'assorbanza dopo aggiunta soltanto della soluzione di SA (6.1). In tal caso l'assorbanza corretta (A_c) sarà dato dalla seguente relazione $A_c=A_m$ - (BA+BR).

8. Calcoli

Attraverso il «grafico di taratura» (o mediante l'equazione della «curva di taratura»), si risale dall'assorbanza corretta alla concentrazione di $N\text{-}NO_2$.
Nel caso sia stata eseguita una diluizione del campione, moltiplicare per il fattore di diluizione.

9. Qualità del dato

Prove effettuate (n=3) da tre laboratori su soluzioni sintetiche di acqua deionizzata hanno fornito i seguenti valori del coefficiente di variazione [CV(%) = (scarto tipo/valore medio)·100]:

concentrazione (mg/L)	CV (%)	Cammino ottico cella (cm)
0,002	5,0	10
0,02	2,2	1
0,2	1,5	1

L'accuratezza è risultata compresa entro il 5% nell'intervallo di concentrazioni 0,002-0,02 mg/L di $N\text{-}NO_2$ ed entro il 2% nell'intervallo 0,02-0,2 mg/L di $N\text{-}NO_2$. Non essendo stati utilizzati materiali di riferimento certificati, l'accuratezza va intesa come grado di accordo tra il risultato della misurazione e il valore di riferimento accettato.
Va tenuto presente che la precisione e accuratezza di un metodo generalmente peggiorano all'aumentare della complessità della matrice.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA), 4-112/4-114.

BARNES H. & FOLKARD A.R. (1951): "The determination of nitrites", *Analyst*, **76**, 599.

BENDSCHNEIDER K. & ROBINS R.J. (1952) "Determination of nitrite in sea water", *J. Marine Research*, **11**, 87.

EPA (1974): "*Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes*", EPA-625/6-74-003a (Cincinnati, Environmental Research Center) p. 215.

FAO (1975): "*Manual of methods in aquatic environment research*", Fisheries Technical Paper, 137 (part. 1), 154.

IRSA (1986): "Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **75**, 485-488.

KERSHAW N.F. & CHAMBERLIN N.S. (1942): "Determination of nitrites. Discussion of the Shinn method as applied to examination of water", *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, **14**, 312.

MATSUNAGA K. & NISHIMURA M. (1974): "A rapid and sensitive method for determination of submicrograms amounts of ammonia in fresh and sea water», *Anal. Chim. Acta*, **7**, 204.

SHNN M.S. (1941): "Colorimetric method for determination of nitrite", *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, **13**, 33.

STRICKLAND J.D.H. & PARSONS T.R. (1968): "*A practical handbook: of seawater analysis*", Fisheries Research Board Canada Bulletin, **167**, 77.

4060. Azoto totale e fosforo totale

1. Principio del metodo

Il metodo si basa su una preliminare trasformazione di tutti i composti dell'azoto e del fosforo totale, organici ed inorganici, a nitrato ed ortofosfato, rispettivamente, mediante ossidazione con una miscela di perossidisolfato, acido borico e idrossido di sodio. Poiché per l'ossidazione di composti azotati è necessaria una miscela ossidante alcalina, mentre l'ossidazione dei composti del fosforo deve essere condotta in ambiente acido, la miscela impiegata nel metodo assicura condizioni ottimali di pH (9,7 all'inizio e 5-6 alla fine della reazione) per la trasformazione simultanea dei composti in questione.
Dopo l'ossidazione, il contenuto di nitrato nel campione viene determinato misurando l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 220 nm. È possibile utilizzare, altresì, il metodo spettrofotometrico basato sulla reazione di diazocopulazione del nitrito, ottenuto dalla riduzione del nitrato dopo percolazione del campione su una colonna di cadmio metallico ramato (metodo 4040 A2).
L'ortofosfato si determina con il metodo spettrofotometrico al blu di molibdeno (metodo 4110).

2. Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione simultanea di azoto totale e fosforo totale in campioni di acque naturali nell'intervallo 0,1-7,0 mg N/L e 1-1000 µg P/L.

3. Interferenze e cause di errore

Le rese della reazione di ossidazione dipendono dal tipo di composto azotato. Nitrato, nitrito, ammoniaca, urea, alcuni amminoacidi alifatici e alcune proteine forniscono rese superiori al 90%; composti caratterizzati dalla presenza di legami semplici N-N danno rese decisamente più basse o addirittura nulle nel caso di legami doppi N=N o di composti eterociclici. Le concentrazioni di questi composti in acque naturali sono tuttavia trascurabili.
In campioni di acqua di mare l'interferenza del cloro libero, che si forma durante il processo di ossidazione, viene eliminata mediante aggiunta di una soluzione riducente (acido ascorbico in miscela con sale sodico dell'acido etilendiamminotetracetico e acido formico) prima dell'aggiunta del molibdato.
La durata della reazione di ossidazione, che dipende dalla decomposizione del perossidisolfato, non deve essere superiore ai 30 minuti purchè la temperatura sia mantenuta costante a 120°C.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".

5. Apparecchiature

5.1 Normale attrezzatura di laboratorio

La vetreria deve essere lavata con detersivi esenti da fosforo, oppure con acido solforico concentrato.

5.2 Bottiglie di vetro spesso resistente alla temperatura di 120°C, con tappo a vite che consenta la chiusura ermetica.

5.3 Autoclave o stufa termostata

La prima assicura migliori condizioni di sicurezza per gli operatori.

6. Reattivi

6.1 *Miscela ossidante*

Sciogliere nell'ordine: 50 g di potassio perossidisolfato ($K_2S_2O_8$) allo 0,001% massimo di azoto, 30 g di acido borico cristallino e 14 g di sodio idrossido in gocce in 1000 mL di acqua deionizzata. La soluzione è stabile per circa due mesi, se conservata al buio e a temperatura ambiente.

6.2 Reagenti per l'azoto

6.2.1 Acido solforico (al 98%) esente da azoto.

6.3 Soluzione riducente per il fosforo

Sciogliere 17,5 g di acido ascorbico $C_6H_8O_6$ e 0,075 g di acido etilendiammino tetracetico sale disodico ($EDTANa_2$) in circa 200 mL di acqua deionizzata. Aggiungere 1,5 mL di acido formico (HCOOH) e portare a 250 mL con acqua. La soluzione è stabile un mese se conservata in frigorifero a 4°C ed al buio.

6.4 Miscela dei reagenti per il fosforo

Dopo aver sciolto separatamente, miscelare le tre soluzioni (6.4.1, 6.4.2 e 6.4.3) e portare a 250 mL con acqua deionizzata. La soluzione (6.4) è stabile un mese se conservata in frigorifero a 4°C e al buio.

6.4.1 Soluzione di antimonio potassio tartrato

Sciogliere 0,1675 g di $KOOC(CHOH)_2COOSbO \cdot 1/2\ H_2O$ in circa 25 mL di acqua deionizzata.

6.4.2 Soluzione di ammonio eptamolibdato

Sciogliere 4,05 g di $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ in circa 50 mL di acqua deionizzata.

6.4.3 Soluzione di acido solforico

Diluire 50,1 mL di acido solforico concentrato (d=1,84) fino a 150 mL con acqua deionizzata.

6.5 Acido solforico concentrato, (H_2SO_4, d=1,84)

6.6 Soluzione di riferimento per l'azoto (0,1 g N/L)

Sciogliere 0,5357 g di glicina ($H_2NCH_2CO_2H$), precedentemente seccata a 110°C per due ore e conservata in essiccatore, in 1 L di acqua deionizzata.

6.7 Soluzione concentrata di fosforo (200 mg P/L)

Sciogliere 0,87874 g di idrogeno fosfato di potassio (KH_2PO_4), precedentemente seccato a 110°C per due ore e conservato in essiccatore, in 1 L di acqua deionizzata.

6.8 Soluzione diluita di fosforo (2 mg P/L)

Prelevare 10 mL della soluzione concentrata di fosforo (6.7) e portare a volume a 1 L con acqua deionizzata.

7. Procedimento

7.1 Digestione del campione

A 50 mL di campione si aggiungono 7 mL di miscela ossidante (6.1) e 0,3 g di $K_2S_2O_8$. Porre i campioni in autoclave a 120°C per 30 minuti. Si consiglia di effettuare le analisi almeno in duplicato. La determinazione del valore del bianco procedurale, ottenuto sottoponendo a digestione 50 mL di acqua deionizzata secondo le modalità indicate, è di fondamentale importanza in quanto il perossidisolfato contiene sempre tracce di azoto.
Al termine della digestione i campioni vanno lasciati raffreddare all'aria e, se necessario, filtrati con filtri di 0,4 µm di porosità (es. policarbonato) esenti da azoto e fosforo, trasferendo tutta l'aliquota digerita in una beuta da 100 mL. Portafiltri, guarnizioni vanno lavati in HCl diluito 1:20, risciacquati, asciugati e conservati al riparo dalla polvere.

7.2 Analisi

7.2.1 Azoto totale

Prelevare 10 mL dal campione digerito, utilizzando una pipetta automatica con puntali monouso, e trasferire l'aliquota in una beuta da 25 mL. Acidificare con 0,15 mL di H_2SO_4 concentrato (6.5) e portare a volume. Misurare l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 220 nm, impiegando celle di quarzo di 1 cm di cammino ottico, contro un bianco preparato seguendo le stesse modalità del campione.
In alternativa l'aliquota prelevata può essere utilizzata, dopo opportuna diluizione, per la determinazione del nitrato mediante reazione di diazocopulazione del nitrito ottenuto dopo percolazione su una colonna di cadmio metallico ramato (metodo 4040 A2). A detto metodo si rimanda per i relativi aspetti procedurali (costruzione delle curve di taratura, analisi e calcoli).

7.2.2 Fosforo totale

Aggiungere ai rimanenti 47 mL di campione nell'ordine: 1,25 mL di soluzione riducente (6.3) e dopo circa 2 minuti, 1,25 mL di miscela di reagenti (6.4). La lettura spettrofotometrica si esegue dopo 5 minuti alla lunghezza d'onda di 882 nm, utilizzando celle di percorso ottico opportuno.
Nel caso in cui non venga effettuata la determinazione dell'azoto totale, il fosforo totale può essere determinato su tutto il campione digerito, aggiungendo 1,5 mL di soluzione riducente (6.3) e, dopo circa due minuti, 1,5 mL di miscela di reagenti (6.4), procedendo poi come già indicato.

7.3 Taratura

Per la taratura seguire la stessa procedura indicata per i campioni, utilizzando soluzioni di riferimento esemplificate in Tab. 1, ottenute diluendo opportunamente le soluzioni di azoto (6.6) e di fosforo (6.8). È consigliabile procedere alla taratura sottoponendo alla digestione anche le soluzioni di riferimento.

Tabella 1: Esempio di soluzioni di lavoro per l'analisi simultanea dell'azoto totale e del fosforo totale

N/P	P (µg/L)	N (mg/L)
20	5	0,10
20	10	0,20
15	20	0,30
10	40	0,40
10	60	0,60
10	80	0,80
10	100	1,00
10	120	1,20
10	200	20,0
13	400	3,00
7,5	600	4,50
7,5	800	6,00
7,5	1000	7,50

8. Calcoli

Dal valore di assorbanza dei campioni, sottratti del valore del bianco procedurale, risalire mediante la curva di taratura alla concentrazione di azoto totale e fosforo totale.

9. Qualità del dato

Prove effettuate (n=7) da due laboratori su soluzioni di glicina e diidrogeno fosfato di potassio in acqua deionizzata contenenti, rispettivamente, 0,1 mg N/L e 10 µg P/L hanno fornito valori del coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100, entro il 6%.
Su un campione di acqua di mare analizzato in triplicato (valore medio delle tre repliche: 2,93 mg/L di azoto totale) si è ottenuto uno scarto tipo pari a 0,322 mg/L.

BIBLIOGRAFIA

GRASSHOF K. (1976): "*Methods of Seawater Analysis*", Verlag Chemie, Weinheim.

TARTARI G., CAMUSSO M., MUNTAU H., BIASCI G., BINELLI A., PREVITALI L. & RENOLDI M. (1995): "Determinazione di nutrienti, clorofille, feopigmenti e metalli nel particellato lacustre raccolto mediante trappole di sedimentazione", *Notiziario dei Metodi Analitici IRSA*, Marzo 1995, 1-17.

VALDERRAMA J.C. (1981): "The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters", *Mar. Chem.*, **10**, 109-122.

4070. Cianuro

I composti dell'acido cianidrico vengono usati in alcuni particolari processi industriali: lavorazione dell'oro e dell'argento, preparazione di fibre acriliche, galvanostegia e galvanoplastica, fotografia.
I cianuri possono essere presenti nelle acque principalmente nelle seguenti forme:

- cianuri semplici solubili, facilmente separabili dalla matrice per distillazione in ambiente acido;
- cianuri complessi solubili, separabili dalla matrice, per distillazione in ambiente acido, solo nel caso di rottura di legami coordinati;
- cianuri insolubili semplici e complessi che possono essere talvolta presenti allo stato di piccole particelle solide sospese nel liquido. In questo caso occorre effettuare, prima della distillazione un trattamento a pH 11-12 all'ebollizione, per liberare lo ione CN^-.

Nota: *l'acidificazione di soluzioni contenti cianuro produce acido cianidrico (HCN) estremamente tossico. Anche il cloruro di cianogeno, che si forma durante il procedimento previsto dal metodo spettrofotometrico è tossico. Si raccomanda quindi di eseguire tutte le manipolazioni sotto cappa ben ventilata, evitando qualsiasi contatto, inalazione o ingestione.*

1. Principio del metodo

L'acido cianidrico, in qualsiasi modo ottenuto con i trattamenti preliminari, può essere determinato quantitativamente seguendo due differenti metodi:

- metodo volumetrico, basato su una titolazione con nitrato di argento e formazione del complesso solubile $Ag(CN)_2^-$, in presenza di p-dimetilamminobenzilidenerodanina come indicatore.
- metodo spettrofotometrico, che prevede la reazione fra il cianuro e la cloramina T a pH inferiore a 8, la successiva reazione del cloruro di cianogeno così ottenuto con piridina dando luogo alla formazione dell'aldeide glutaconica, che con il reattivo pirazolone-piridina forma una sostanza colorata in azzurro che presenta un massimo di assorbimento a 620 nm.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile alle acque di scarico, superficiali e sotterranee.
Il metodo volumetrico è utilizzabile per concentrazioni di cianuri superiori a 1 mg/L. Il metodo spettrofotometrico è utilizzabile per concentrazioni di cianuri superiori a 0,02 mg/L. Concentrazioni più basse possono essere determinate impiegando la tecnica estrattiva (vedi Paragrafo 7.5). Applicando quest'ultima tecnica è possibile conseguire un limite di rivelabilità di 0,001 mg/L.

3. Interferenze e cause di errore

Le sostanze ossidanti, rilevabili con una cartina amido-iodurata, potrebbero agire sul com-

posto colorato ed ossidare il CN^-. Se presenti possono essere rimosse addizionando cautamente un agente riducente quale l'acido ascorbico.
I solfuri, che arrecano disturbo sia in fase di distillazione sia al momento del dosaggio, devono essere rimossi con l'aggiunta, a pH 10-11, di carbonato di piombo in polvere finchè non si abbia più formazione di precipitato di PbS (evitare un eccesso di reattivo).
Gli acidi grassi, che distillano e rendono difficilmente apprezzabile il punto di viraggio nell'analisi volumetrica, possono essere rimossi per estrazione con un volume di solvente pari al 20% del volume del campione, dopo acidificazione dello stesso a pH 6÷7con acido acetico (1+9); dopo l'estrazione riportare il pH a 12 con una soluzione di NaOH.
Alcune sostanze possono provocare colore o torbidità; questa interferenza può essere eliminata con il procedimento di distillazione.
Le aldeidi convertono i cianuri in nitrili nelle condizioni di distillazione; questa interferenza può essere eliminata per aggiunta di nitrato di argento al campione. Altre interferenze vengono eliminate durante la fase di distillazione.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il prelievo e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".
La conservazione del campione viene effettuata aggiungendo al campione una soluzione concentrata di NaOH (10 M) fino a pH≅12. È bene conservare il campione in bottiglia ben chiusa e in luogo fresco e buio.

5. Apparecchiature

5.1 Materiale di uso comune di laboratorio

5.2 Apparecchio di distillazione del tipo illustrato in Fig. 1.

5.3 Spettrofotometro idoneo per misure di assorbanza a 620 nm.

6. Reattivi

Utilizzare reattivi del tipo puro per analisi ed acqua distillata o deionizzata.

6.1 Soluzione di idrossido di sodio 1 M

Sciogliere 40 g di idrossido di sodio (NaOH) in 1000 mL di acqua.

6.2 Acido solforico 1+1

6.3 Soluzione di cloruro di magnesio (510 g/L)

Sciogliere 51 g di cloruro di magnesio esaidrato ($MgC1_2 \cdot 6H_2O$) in acqua e diluire a 100 mL.

6.4 Soluzione di acido acetico 1+4

Aggiungere un volume di acido acetico concentrato a 4 volumi di acqua distillata.

6.5 Soluzione di idrossido di sodio 0,2 M

Addizionare a 1 volume di idrossido di sodio 1 M (6.1) 4 volumi di acqua.

6.6 Soluzione di cloramina T (10 g/L)

Sciogliere 10 g di cloramina T in 1000 mL di acqua. La soluzione è stabile per una settimana e va conservata in frigorifero.

6.7 Soluzione di 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-one (5 g/L)

Preparare una soluzione satura (5 g/L) aggiungendo 0,25 g di pirazolone a 50 mL di acqua calda (circa 75°C); raffreddare agitando di tanto in tanto.

6.8 Piridina

6.9 Bis-pirazolone (3,3′-dimetil-1,1′-difenil-[4,4′-bi-2-pirazolina]-5,5′-dione).

6.10 Reattivo misto piridina-pirazolone

Miscelare 125 mL di soluzione filtrata di 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-one (6.7) con la soluzione filtrata ottenuta sciogliendo 0,025 g di bis-pirazolone in 25 mL di piridina (6.8). Preparare questo reattivo giornalmente.

6.11 Soluzione concentrata di cianuro (*) (1 mL=1 mg)

Sciogliere 2,51 g di cianuro di potassio e 2,0 g di idrossido di potassio in 1000 mL di acqua. Controllare il titolo ogni settimana con una soluzione di nitrato di argento a titolo noto (metodo di Liebig modificato).

6.12 Soluzione diluita I di cianuro (*) (1 mL=10 μg)

Diluire 10 mL della soluzione (6.11) a 1000 mL. La soluzione va preparata giornalmente.

6.13 Soluzione diluita II di cianuro (*) (1 mL=1 μg)

Diluire 10 mL della soluzione (6.12) a 100 mL; la soluzione va preparata giornalmente.

6.14 Acido ascorbico

6.15 Carbonato di piombo

6.16 Solvente per l'estrazione dei grassi (iso-ottano o n-esano o cloroformio)

6.17 1-butanolo

6.18 Soluzione di indicatore al p-dimetilamminobenzilidenerodanina (0,2 g/L)

Sciogliere 0,02 g di p-dimetilaminobenzilidenerodanina in 100 mL di acetone.

6.19 Soluzione di nitrato di argento

Sciogliere 3,2467 g di nitrato d'argento ($AgNO_3$) seccato a 140°C, in 1000 mL di acqua. Il titolo di questa soluzione viene determinato con una soluzione a titolo noto di cloruro di sodio (NaCl) usando come indicatore K_2CrO_4. Sulla base del titolo così determinato, diluire opportunamente 500 mL di soluzione (6.19) per far sì che 1 mL equivalga a 1 mg di CN^-.

(*) Attenzione: usare tutte le precauzioni suggerite per la manipolazione di sostanze estremamente tossiche!

6.20 Soluzione di idrogeno fosfato disodico

Sciogliere 5 g di Na_2HPO_4 anidro in 100 mL di acqua.

6.21 Soluzione di indicatore al blu di bromotimolo 0,4%

6.22 Soluzione di indicatore al blu di bromotimolo 0,04%

Diluire 10 mL della soluzione (6.21) a 100 mL.

7. Procedimento

7.1 Solubilizzazione dei cianuri insolubili

Nel caso di presenza di cianuri insolubili allo stato di piccole particelle solide sospese nel liquido portare il campione, che è stato sottoposto ai trattamenti indicati per eliminare le interferenze, all'ebollizione per alcuni minuti (normalmente 10 minuti risultano sufficienti) curando che il pH si mantenga sul valore di 11. Raffreddare e filtrare.

7.2 Distillazione

Introdurre il liquido, già sottoposto ai pretrattamenti ritenuti necessari, nel pallone da distillazione, tenendo presente che, per concentrazioni di CN^- non superiori a 10 mg/L, occorre distillare un campione di 500 mL mentre per concentrazioni superiori a 10 mg/L, occorre una quantità proporzionalmente inferiore, che si diluirà in ogni caso a 500 mL con acqua. Predisporre l'apparecchio di distillazione (Fig. 1) sotto cappa, ponendo in ciascun assorbitore "f" 50 mL di NaOH 1 M (6.1), che possono essere diluiti con acqua al fine di assicurare un battente liquido sufficiente.
Collegare l'apparecchio ad una pompa da vuoto ad acqua e regolare, tramite l'apposita pinza

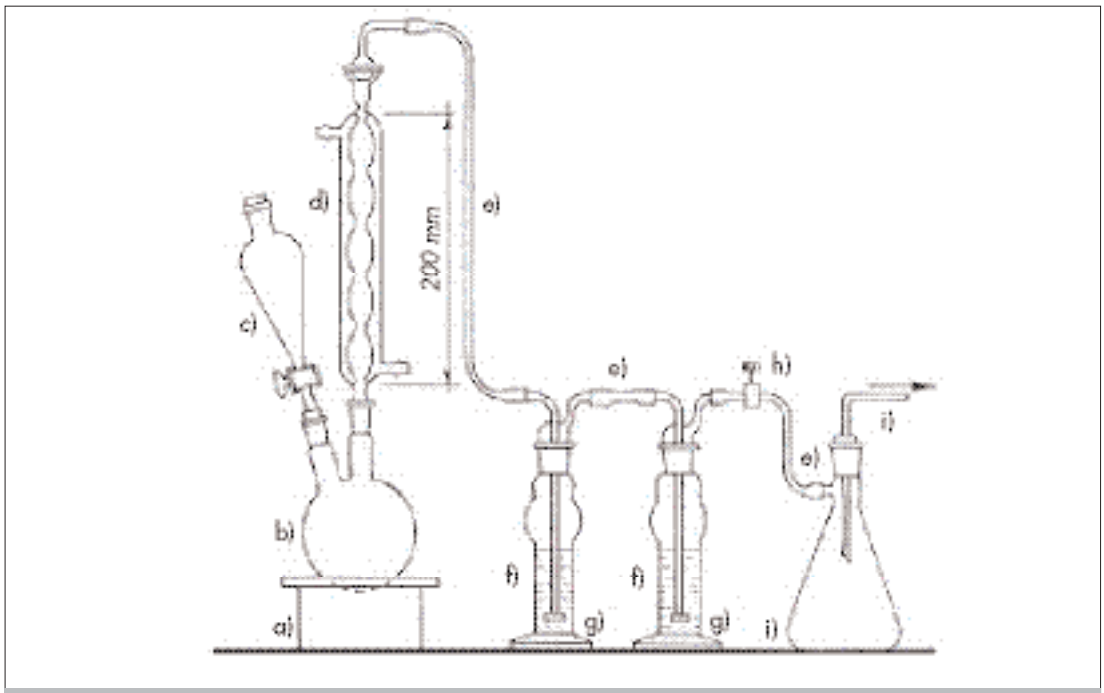


Figura 1: Esempio di apparecchiatura per la distillazione dei cianuri. a) sorgente di calore; b) pallone di distillazione; c) imbuto di carico; d) refrigerante; e) tubi di raccordo; f) assorbitore; g) setto poroso; h) pinza per la regolazione del flusso; i) beuta da vuoto; l) tubo di collegamento con il vuoto.

"h", il flusso dell'aria in modo che il gorgogliamento non sia superiore a 1÷2 bolle al secondo. Assicurare la tenuta dei giunti utilizzando le relative pinze. Aggiungere, attraverso "c", 50 mL di acido solforico 1+1 (6.2) e 10 mL di soluzione di cloruro di magnesio (6.3). Riscaldare il pallone "b" per un'ora evitando, per quanto possibile, che il vapor d'acqua superi metà dell'altezza del refrigerante, mentre si mantiene in funzione il passaggio di una corrente di aria che ha il compito di trasportare tutto l'acido cianidrico liberato nel recipiente di raccolta. Interrompere, quindi, il riscaldamento e lasciare raffreddare mantenendo il gorgogliamento di aria per altri 15 minuti; interrompere il flusso di aria e trasferire il contenuto degli assorbitori in un matraccio tarato di volume C a seconda della ipotizzata concentrazione in CN^-. Lavare i tubi "e" e gli assorbitori con acqua che viene aggiunta nello stesso matraccio tarato; portare a volume con acqua.

7.3 Determinazione volumetrica mediante titolazione di Liebig modificata

Prelevare un volume B del distillato portato a volume; aggiungere 0,5 mL di soluzione di p-dimetilamminobenzilidenerodanina (6.18) e titolare con la soluzione di nitrato di argento (6.19) finchè il colore vira dal giallo al rosa. Eseguire anche una prova in bianco su un identico volume B di acqua contenente la stessa quantità di idrossido di sodio contenuto nella soluzione sottoposta a titolazione.

7.4 Determinazione spettrofotometrica

7.4.1 Taratura

Porre in diversi cilindri graduati a tappo smerigliato da 50 mL rispettivamente 10 mL di almeno quattro soluzioni di taratura ottenute diluendo la soluzione (6.11, 6.12, 6.13) più adatta affinchè la misura del campione rientri nell'intervallo fissato dalla curva di taratura e porre in un altro matraccio 10 mL di acqua (bianco). Aggiungere 5 mL di idrossido di sodio 0,2 M (6.5) e neutralizzare con acido acetico (6.4), in presenza di una goccia di blu di bromotimolo (6.22) fino a colorazione gialla, cioè fino a circa pH 5.
Aggiungere 0,2 mL di soluzione di cloramina T (6.6), tappare i cilindri, mescolare per rovesciamento due o tre volte; lasciare riposare per 1 o 2 minuti; aggiungere 5,0 mL di reattivo misto piridina-pirazolone (6.10), tappare di nuovo, mescolare per rovesciamento; lasciare sviluppare il colore per 20 minuti, diluire portando al volume di 25 mL con acqua, mescolare e determinare l'assorbanza delle soluzioni a 620 nm contro il bianco. Costruire una curva di taratura.

7.4.2 Dosaggio del campione

Prelevare un volume B (di solito 15 mL) del liquido di assorbimento portato a volume (7.2) e trasferirlo in un cilindro graduato a tappo smerigliato da 50 mL. Procedere come stabilito per la taratura.

7.5 Dosaggio previa concentrazione del complesso colorato

Operare come in 7.4.2 fino al termine dei 20 minuti di sviluppo del colore. A questo punto aggiungere 1 mL di soluzione di Na_2HPO_4 (6.20). Misurare esattamente 10 mL di butan-1-olo (6.17) che vengono aggiunti in un cilindro a tappo smerigliato da 50 mL. Tappare e mescolare per rovesciamento. Se le due fasi non si separano entro 3 minuti, aggiungere altra soluzione di Na_2HPO_4 e mescolare ancora. Prelevare una parte della fase organica e misurare l'assorbanza a 620 nm contro un bianco ottenuto per estrazione del bianco dei reattivi.

8. Calcoli

8.1 Determinazione volumetrica

La concentrazione in cianuro del campione in esame viene calcolata con la seguente formula:

$$\text{Cianuri}(\text{mg/L di } CN^-) = \frac{A}{B} \cdot \frac{C}{D} \cdot 1000$$

dove:
A= mg di CN- corrispondenti ai mL di nitrato di argento impiegati nella titolazione dopo aver sottratto i mL consumati dal bianco dei reattivi;
B = volume (mL) di distillato utilizzato per la titolazione;
C = volume totale (mL) del distillato, raccolto in matraccio e portato con lavaggi a volume;
D = volume (mL) di campione sottoposto a distillazione.

8.2 Determinazione spettrofotometrica

La concentrazione in cianuro del campione in esame viene calcolata con la seguente formula:

$$\text{Cianuri}(\text{mg/L di } CN^-) = \frac{A}{B} \cdot \frac{C}{D} \cdot 1000$$

dove:
A = mg di CN^- letti sulla curva di taratura;
B = volume (mL) del distillato, portato a volume, sottoposto a dosaggio spettrofotometrico;
C = volume totale (mL) del distillato raccolto in matraccio e portato con i lavaggi a volume;
D = volume (mL) di campione sottoposto a distillazione.

9. Qualità del dato

9.1 Determinazione volumetrica

Prove effettuate (n=5) da un singolo laboratorio su soluzioni sintetiche di acqua deionizzata contenenti 2 mg/L di CN^- hanno fornito un valore del coefficiente di variazione, [CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100], pari al 6% ed un'accuratezza del 5%.

9.2 Determinazione spettofotometrica

Prove effettuate (n=5) da un singolo laboratorio su soluzioni sintetiche di acqua deionizzata contenenti 0,5 mg/L di CN^- hanno fornito un valore del coefficiente di variazione, [CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100], pari al 2% ed un'accuratezza del 3%.
Va tenuto presente che precisione e accuratezza generalmente peggiorano all'aumentare della complessità della matrice.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): *"Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater"*, XX Ed., (Washington, APHA), 4-32/4-40.

EPA (1979): "*Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes*", Method 335.2, Environmental Monitoring and Support, Cincinnati, OH 45268.

IRSA (1986): "Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **75**, 485-488.

4080. Cloro attivo libero

Il cloro trova impiego in una vastissima gamma di produzioni: carta, fibre tessili, coloranti, solventi, plastiche, pitture, medicinali, insetticidi. È inoltre molto usato come sbiancante e come sterilizzante. Quest'ultima applicazione è largamente diffusa nel trattamento delle acque a scopo potabile, sia per l'abbattimento di sapori ed odori sgradevoli, sia, in più ampia misura, per la loro disinfezione, grazie all'elevata capacità ossidante.
Il cloro, infine, è impiegato nelle acque di raffreddamento e nelle acque di scarico industriali come alghicida e battericida.
Il cloro attivo corrisponde alla somma del cloro disponibile libero (OCl^- e HOCl) e del cloro combinato disponibile (clorammine o altri composti con legami N-Cl, ad esempio dicloroisocianurato di sodio). Quando il cloro è presente nelle acque in forma disponibile, cioè in grado di agire come ossidante, i termini libero, disponibile, attivo e residuo, differentemente usati in letteratura, si equivalgono.
Il pH e la temperatura giocano un ruolo importante nella definizione delle specie presenti in un'acqua: all'aumentare del pH la specie prevalente è il cloro disciolto ($Cl_{2(aq)}$). A pH 6 ed alla temperatura di 5°C il contenuto di cloro totale corrisponde a quello dell'HOCl, mentre a 25°C ed a pH 9, a parità di concentrazione di HOCl, il contenuto di cloro totale risulta circa 30 volte superiore.

1. Principio del metodo

Il metodo consente la determinazione del cloro libero (OCl^-, HOCl e $Cl_{2(aq)}$) e combinato (monocloroammina, dicloroammina e tricloroammina).
Il cloro libero ossida immediatamente una soluzione di N,N-dietil-p-fenilendiammina (DPD) a pH 6,2-6,5 con formazione di un composto colorato in rosso, la cui assorbanza viene misurata alla lunghezza d'onda di 510 nm.
L'adozione di opportune varianti nella procedura, relativamente all'aggiunta di ioduro di potassio e alla sequenza impiegata nell'aggiunta dei reattivi, consente la determinazione anche delle clorammine oltre che del cloro libero.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ad acque naturali e di scarico. Operando con 100 mL di campione, il metodo si rivela idoneo a determinare concentrazioni di cloro comprese tra 0,03 e 5 mg/L o superiori, previa opportuna diluizione del campione.

3. Interferenze e cause di errore

La reazione colorimetrica deve essere condotta a temperatura ambiente; temperature elevate facilitano infatti la reazione di idrolisi delle cloroammine, determinando un aumento apparente delle concentrazioni del cloro libero.
Il controllo del pH riveste un'importanza fondamentale; bassi valori di pH impediscono la differenziazione fra cloro libero e monocloroammina e tra monocloro e dicloroammina, mentre valori elevati favoriscono reazioni con l'ossigeno.
L'ossigeno disciolto interferisce se presente in concentrazioni superiori a 10 mg/L; interferi-

scono inoltre composti clorurati ad azione ossidante come il diossido di cloro e composti ossidanti a medio ed alto potenziale ossidazione quali ozono, acqua ossigenata, cromati, bromo, iodio, bromoammine e iodoammine.
Il manganese allo stato ossidato interferisce, ma l'interferenza può essere corretta conducendo una determinazione preliminare in presenza di arsenito di sodio come avanti descritto (7.2.3).
Le interferenze di ferro (III) e rame (II) fino a 10 mg/L possono essere mascherate aggiungendo sequestranti tipo EDTA alla soluzione tampone o a quella reagente DPD. L'EDTA ha inoltre la proprietà di ritardare il deterioramento della soluzione di DPD dovuta all'ossidazione chimica ed elimina gli errori causati dalla presenza di ossigeno disciolto, impedendo eventuali reazioni catalitiche favorite dalla presenza di metalli in tracce.

4. Campionamento e conservazione del campiome

Il prelievo e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". I risultati più attendibili nel dosaggio del cloro attivo si ottengono su campioni prelevati di fresco. Si consiglia il dosaggio sul posto del prelievo, evitando l'esposizione al calore, alla luce ed una forte agitazione.
Ove ciò non sia possibile riempire completamente il recipiente di campionamento evitando di lasciare aria tra liquido e tappo. Conservare al buio e a 4°C fino al momento dell'analisi, che dovrà eseguirsi al massimo entro 24 ore.

5. Apparecchiatura

5.1 Normale attrezzatura da laboratorio

5.2 Spettrofotometro per misure nel campo del visibile, munito di celle aventi cammino ottico di 1 cm.

L'impiego di celle con cammino ottico superiore (fino a 10 cm), consente di aumentare la sensibilità del metodo.

6. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e le soluzioni preparate con acqua distillata e/o deionizzata, esente da sostanze ossidanti o riducenti. Verificarne l'assenza con i seguenti saggi:

- a 100 mL di acqua addizionare 1 g di ioduro di potassio e, dopo un minuto, 5 mL della soluzione tampone (6.2) e 5 mL di DPD (6.4); la soluzione deve restare incolore;
- a 100 mL di acqua addizionare 0,1 mL di sodio ipoclorito (6.10) e, dopo due minuti, 5 mL della soluzione tampone (6.2) e 5 mL di DPD (6.4); la soluzione deve assumere una colorazione rosa.

6.1 Sale sodico diidrato dell'acido etilendiamminotetracetico (EDTA)

6.2 Soluzione tampone (pH=6,5)

In un matraccio contenente circa 800 mL di acqua, sciogliere 24 g di fosfato disodico (Na_2HPO_4) e 46 g di fosfato monopotassico (KH_2PO_4), aggiungere 100 mL di acqua in cui sono stati sciolti 0,8 g di sale disodico dell'acido etilendiamminotetracetico (6.1) e diluire il tutto ad 1 litro con acqua. La soluzione deve essere conservata in frigorifero per evitare che lo sviluppo di muffe provochi interferenze nella determinazione.

6.3 Soluzione di acido solforico (1+3)

Aggiungere lentamente 25 mL di acido solforico (H_2SO_4, d=1,84) a 50 mL di acqua. Dopo raffreddamento, diluire a 100 mL con acqua.

6.4 Soluzione di N,N-dietil-p-fenilendiammina (DPD)

Sciogliere 1,5 g di N,N-dietil-p-fenilendiammina solfato pentaidrato in acqua insieme a 8 mL di acido solforico (1+3) (6.3) e 200 mg di EDTA (6.1). Diluire a 1 litro con acqua. Conservare la soluzione in bottiglia di vetro scuro e scartare le soluzione qualora il bianco dei reattivi fornisca un'assorbanza superiore a 0,002 utilizzando celle da 1 cm di cammino ottico.

6.5 Ioduro di potassio in cristalli

6.6 Ioduro di potassio (5 g/L)

Sciogliere 500 mg di ioduro di potassio in 100 mL di acqua. Conservare la soluzione in bottiglia di vetro scuro preferibilmente in frigorifero; scartare la soluzione quando si sviluppa un colore giallo.

6.7 Acido acetico glaciale (d=1,05)

6.8 Soluzione di tiosolfato di sodio 0,01 N

6.9 Indicatore salda d'amido

Stemperare in un mortaio 5-6 g di amido con alcuni millilitri di acqua fredda. Versare la pasta risultante in 1000 mL di acqua bollente. Lasciar depositare una notte e utilizzare il liquido sovrastante. La soluzione può essere stabilizzata aggiungendo per ogni litro di soluzione circa 1 g di acido salicilico.

6.10 Soluzione di ipoclorito di sodio (0,1 g/L di cloro)

Diluire opportunamente al momento dell'uso una soluzione commerciale a titolo noto. Effettuare il controllo del titolo nel seguente modo: introdurre 2 mL di acido acetico glaciale in una beuta contenente 25 mL di acqua; aggiungere circa 1 g di ioduro di potassio e 50 mL della soluzione (6.10). Miscelare accuratamente e titolare con la soluzione di tiosolfato di sodio (6.8) fino ad ottenere un colore giallo paglierino; aggiungere quindi 2 mL di soluzione di salda d'amido (6.9) e continuare a titolare fino a completa decolorazione della soluzione.
Per risalire alla concentrazione di cloro attivo nella soluzione in esame applicare la seguente formula:

$$\text{Cloro}(\text{mg/L}) = \frac{a \cdot N \cdot 35{,}45}{V} \cdot 1000$$

dove:
a = volume (mL) di soluzione di tiosolfato di sodio impiegato per la titolazione del campione;
N = normalità del tiosolfato di sodio;
V = volume (mL) di campione prelevato;
35,45 = peso equivalente del cloro.

La soluzione va controllata settimanalmente.

6.11 Soluzione di arsenito di sodio (5 g/L)

Sciogliere 500 mg di arsenito di sodio ($NaAsO_2$) in 100 mL di acqua.

6.12 Soluzione concentrata di permanganato di potassio

Sciogliere 0,891 g di permanganato di potassio ($KMnO_4$) in un matraccio tarato da 1 litro e portare a volume con acqua.

6.13 Soluzione diluita di permanganato di potassio

Introdurre 10 mL della soluzione concentrata (6.12) in un matraccio tarato da 100 mL e portare a volume con acqua. Quando 1 mL di questa soluzione viene diluito a 100 mL con acqua viene prodotto un colore uguale a quello di 1 mg/L di cloro che abbia reagito con il reattivo (6.4).

7. Procedimento

7.1 Taratura

Effettuare la taratura utilizzando soluzioni di ipoclorito o di permanganato di potassio.

7.1.1 Taratura con soluzione di ipoclorito

In matracci da 100 mL preparare soluzioni di taratura aventi concentrazioni di cloro comprese tra 0,05 e 4 mg/L diluendo opportunamente la soluzione (6.10) con acqua.
In altrettante beute da 250 mL trasferire 5 mL della soluzione tampone (6.2) e 5 mL della soluzione di DPD (6.4); entro 1 minuto dalla miscelazione di queste due soluzioni trasferire nelle beute il contenuto dei matracci tarati da 100 mL. Agitare e misurare entro due minuti l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 510 nm. Tracciare la curva di taratura riportando in ascissa le concentrazioni del cloro e in ordinata i corrispondenti valori di assorbanza, corretti del valore del bianco. Controllare un punto della curva di taratura giornalmente e rifare la curva stessa ogniqualvolta viene ripreparata la soluzione di DPD.

7.1.2 Taratura con soluzione di permaganato di potassio

In matracci da 100 mL preparare soluzioni di taratura aventi concentrazioni di cloro comprese tra 0,05 e 4 mg/L diluendo opportunamente la soluzione (6.13) con acqua. Procedere quindi come descritto al punto 7.1.1 a partire dal secondo capoverso.

7.2 Determinazione

Si consiglia di utilizzare vetreria separata (incluse le celle dello spettrofotometro) per la determinazione del cloro libero e del cloro combinato, per evitare contaminazioni da parte dello ioduro di potassio.

7.2.1 Cloro libero

In una beuta avente capacità di 250 mL, contenente 5 mL di soluzione tampone (6.2) e 5 mL di soluzione di DPD (6.4), trasferire entro 1 minuto 100 mL di campione o una sua aliquota diluita a 100 mL con acqua.
Agitare e misurare subito l'assorbanza nelle stesse condizioni utilizzate per la taratura. Controllare che il pH della soluzione di misura sia compreso tra 6,2 e 6,5; in caso contrario aumentare l'aggiunta di tampone. Ricavare dalla curva di taratura la concentrazione C_1. Con questo dosaggio viene determinato il cloro dovuto all'acido ipocloroso, allo ione ipoclorito e al cloro molecolare presente.

7.2.2 Cloro totale

Procedere come indicato al primo capoverso del punto 7.2.1. Aggiungere quindi 1 g di io-

duro di potassio (6.5), agitare e dopo 2 minuti esatti misurare l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 510 nm. Ricavare dalla curva di taratura la concentrazione C_2.

7.2.3 Correzione dell'interferenza del manganese

Se è presente manganese allo stato ossidato, prelevare 100 mL di campione o una sua aliquota diluita a 100 mL e porli in una beuta da 250 mL. Aggiungere 1 mL di arsenito di sodio (6.11) e miscelare. Aggiungere quindi 5 mL di soluzione tampone (6.2) e 5 mL di soluzione di DPD (6.4). Agitare e misurare l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 510 nm. Ricavare dalla curva di taratura la concentrazione C_3 dovuta all'interferenza del manganese.

7.2.4 Cloro libero e cloro combinato come monocloroammina

Alla soluzione proveniente dal dosaggio del cloro libero (7.2.1) aggiungere 2 gocce (0,1 mL) di soluzione di ioduro di potassio (6.6). Miscelare e misurare immediatamente l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 510 nm. Ricavare dalla curva di taratura la concentrazione C_4.

7.2.5 Cloro libero e cloro combinato come monocloroammina e dicloroammina

Alla soluzione precedente (7.2.4) aggiungere alcuni cristalli (0,1 g) di ioduro di potassio; miscelare, attendere 2 minuti e misurare l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 510 nm. Ricavare dalla curva di taratura la concentrazione C_5.

7.2.6 Cloro libero e metà del cloro combinato come tricloroammina

In una beuta avente capacità di 250 mL aggiungere 100 mL di campione o una sua aliquota diluita a 100 mL con acqua e 2 gocce (0,1 mL) di soluzione di ioduro di potassio (6.6). Agitare e trasferire il contenuto in una seconda beuta da 250 mL in cui sono stati posti, immediatamente prima del trasferimento del campione nella prima beuta, 5 mL di soluzione tampone (6.2) e 5 mL di soluzione di DPD (6.4). Misurare immediatamente l'assorbanza alla lunghezza d'onda di 510 nm e ricavare dalla curva di taratura la concentrazione C_6.

8. Calcoli

Il contenuto di cloro libero e totale si calcola nel modo seguente:

$$\text{Cloro libero (mg/L)} = (C_1\text{-}C_3)$$
$$\text{Cloro totale (mg/L)} = (C_2\text{-}C_3)$$

Nel caso in cui si voglia calcolare anche il cloro combinato come monocloroammina, dicloroammina e tricloroammina si applicano le seguenti formule:

$$\text{Cloro (mg/L) (monoclorammina)} = (C_4\text{-}C_1)$$
$$\text{Cloro (mg/L) (dicloroammina)} = (C_5\text{-}C_4)\text{, in assenza di tricloroammina}$$
$$\text{Cloro (mg/L) (dicloroammina)} = (C_5\text{-}C_6)\text{, in presenza di tricloroammina}$$
$$\text{Cloro (mg/L) (tricloroammina)} = 2(C_6\text{-}C_1)\text{, in assenza di monoclorammina}$$
$$\text{Cloro (mg/L) (tricloroammina)} = 2(C_6\text{-}C_4)\text{, in presenza di monocloroammina}$$

dove:
C_1, C_2, C_3, C_4, C_5, C_6 sono le concentrazioni ricavate dalla curva di taratura nel corso delle determinazioni 7.2.1-7.2.6.

9. Qualità del dato

Dati pubblicati dall'Organizzazione Mondiale della Sanità, relativi a misure di cloro libero e combinato effettuate da 25 laboratori hanno mostrato una precisione espressa come coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100, del 20-28% ed un'accuratezza espressa come differenza percentuale tra il valore medio e il valore di riferimento del 16%.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1992): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA), 4-63/4-64.

DIN (1984): "*Gasformige Bestandteile (gruppe G). Bestimmung von freiem Chlor und Gesamtchlor (G4)*", D1N 38408, teil 4, Berlin.

EPA (1979): "*Methods for chemical analysis of water and wastes*", EPA 330.5 (Cincinnati, Environmental Research Center).

GEO Clifford White (1972): "*Handbook of Chlorination*", Van Nostrand Reinhold Company, New York.

IRSA (1986): "Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **75**, 485-488.

ISO (1985): "*Determination of free chlorine and total chlorine-Part 2: colorimetric method using N,N-diethyl-1,4-phenylenediamine, for routine control purpose*", International Standard 7393/2, Ist edition.

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ (1997): "*Metodi per le acque destinate al consumo umano*", Rapporti ISTISAN 97/8, 81-89.

*PALIN A.T. (1967): "*Methods for the determination, in water, of free and combined available chiorine, chlorine dioxide and chlorite, bromine, iodine and ozone, using diethyl-p-phenylene diamine (DPD)*", J. Inst. Water Eng., **21**, 537.*

UNICHIM (1974): "*Determinazione del cloro attivo, libero e totale*", Unichim (Milano).

WHO (1982): "*Examination of water for pollution control*", Pergamon Press (Oxford).

4090. Cloruro

Numerosi cloruri si trovano in natura come minerali, fra questi i più abbondanti sono: salgemma e sale marino (NaCl), silvite (KCl), carnallite ($KMgCl_3 \cdot 6H_2O$). Lo ione cloruro costituisce lo 0,045% della crosta terrestre, mentre l'acqua di mare contiene 19,4 g Cl/L.
È contenuto in numerosissimi composti inorganici di interesse industriale (sodio, calcio e alluminio cloruro). Soluzioni acquose di acido cloridrico trovano larghissimo impiego nelle attività manifatturiere; il cloruro di sodio viene utilizzato in metallurgia, nella concia delle pelli, nelle produzioni del vetro e delle ceramiche.
I composti dello ione cloruro sono generalmente solidi cristallini, stabili a temperatura ambiente e molto solubili in acqua, ad eccezione del piombo cloruro e del cloruro di mercurio (I), che danno composti covalenti poco solubili.
Concentrazioni tipiche di cloruri in acque lacustri risultano comprese tra 2 e 10 mg/L; in acque fluviali le concentrazioni appaiono molto diversificate anche se raramente superano i 50 mg/L.
Per il dosaggio dello ione cloruro nelle acque vengono qui presentati tre metodi per titolazione:

A1 - Titolazione diretta con nitrato di argento in ambiente neutro o leggermente basico.
A2 - Titolazione diretta con cloruro di mercurio (II) in ambiente acido.
B - Titolazione diretta con nitrato di argento in ambiente acido.

Due di essi (A1 e A2) comportano il rilevamento del punto finale mediante viraggio di un indicatore interno, mentre il metodo B contempla la titolazione per via potenziometrica. I metodi consentono il dosaggio del cloruro libero e di quello legato spostabile da Ag(I) o da Hg(II) nelle condizioni di reazione.

METODO A1 - Titolazione argentometrica con indicatore

1. Principio del metodo

Titolazione degli ioni cloruro con una soluzione di nitrato d'argento in ambiente neutro o leggermente basico, in presenza di cromato di potassio come indicatore: dopo la precipitazione quantitativa del cloruro d'argento, si ha colorazione rosso mattone, persistente, del cromato d'argento.

2. Campo di applicazione

Questo metodo, applicabile alle acque di scarico, superficiali e sotterranee, consente il dosaggio dei cloruri in acque relativamente limpide, non troppo colorate e che non contengano una quantità troppo elevata di cationi, i quali diano origine al pH di lavoro a osso- o idrossido-sali oppure a idrossidi poco solubili, o di anioni, che possono dare luogo a precipitati con lo ione argento o con lo ione cromato (indicatore), o di specie chimiche che complessino lo ione Ag(I) o che riducano detto ione o lo ione cromato (vedi Capitolo 3).
Alcune di queste interferenze, se presenti in piccola quantità, possono essere eliminate o minimizzate con trattamenti opportuni.

Nel campione sottoposto alla titolazione con una soluzione di nitrato di argento 0,1 N (come indicato nel metodo) si possono dosare da 3,5 a 70 mg di cloruri (1÷20 mL di titolante) corrispondenti a 35 ÷ 700 mg/L se si usano 100 mL di acqua da analizzare; la titolazione è ancora possibile con una soluzione 0,015 N di $AgNO_3$, ma l'apprezzamento del viraggio è più difficile e quindi meno accurato.

3. Interferenze e cause di errore

Possono interferire specie complessanti o precipitanti l'argento.
Interferiscono gli ioni bromuro, ioduro, cianuro, tiocianato e arseniato che vengono calcolati come cloruri; ioduri e tiocianati falsano anche il punto di viraggio per fenomeni di adsorbimento.
L'interferenza dei solfuri, tiosolfati e solfiti può essere rimossa aggiungendo, all'ebollizione, una soluzione di perossido d'idrogeno al 30%. Gli ortofosfati interferiscono se presenti in concentrazione superiore a 250 mg/L, poichè precipitano come fosfato d'argento.
Il ferro (III), in concentrazione superiore a 10 mg/L, maschera il punto finale della titolazione.
A seconda della quantità, i cationi piombo e bario precipitano con il cromato, i cationi idrolizzabili (alluminio, ferro, bismuto, stagno, zinco, ecc.) possono precipitare al pH di titolazione, i cationi colorati (rame, nichel, cobalto) disturbano l'apprezzamento del viraggio. L'eventuale colorazione o torbidità del campione può essere eliminata mediante preliminare trattamento con una sospensione di idrossido di alluminio e/o con carbone attivo.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il prelievo e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".

5. Apparecchiature

Normale attrezzatura di laboratorio e buretta graduata di volume opportuno.

6. Reattivi

Si debbono utilizzare reattivi di grado analitico.

6.1 Acqua esente da cloruri

Per la preparazione dei reattivi è opportuno impiegare acqua bidistillata o deionizzata e distillata.

6.2 Soluzione di riferimento di nitrato d'argento 0,1 N

Sciogliere circa 17 g di nitrato d'argento ($AgNO_3$) in acqua e trasferirli quantitativamente in un matraccio tarato da 1000 mL.
Portare a volume con acqua, avendo cura di ben omogeneizzare la soluzione. L'esatta concentrazione di questa soluzione deve essere controllata, anche se si sono impiegate fiale certificate pronte per la diluizione, titolando con la stessa 20,0 mL della soluzione di riferimento di cloruro di potassio 0,1 N (6.3), secondo le modalità descritte al Paragrafo 7.2. Tale controllo va effettuato almeno in doppio, prima di iniziare la serie di analisi. Lo scarto tra due prove non deve superare 0,2 mL.
Il calcolo della normalità esatta N della soluzione si effettua nel modo seguente:

$$N = \frac{N_1 \cdot 20}{V}$$

dove:
N_1 = normalità della soluzione di cloruro di potassio (6.3);
V = volume (mL) della soluzione di $AgNO_3$ impiegato nella titolazione e corretto del bianco.

La soluzione deve essere conservata in recipiente di vetro scuro.

6.3 Soluzione di riferimento di cloruro di potassio 0,1 N

Trasferire 7,4501 g di cloruro di potassio (KCl), previamente essiccato fino a peso costante in stufa a 180°C e raffreddato in essiccatore, in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua. Si consiglia di rinnovare la soluzione ogni mese.

6.4 Soluzione di cromato di potassio

Sciogliere 50 g di cromato di potassio (K_2CrO_4) in poca acqua. Aggiungere nitrato d'argento fino ad incipiente formazione di precipitato rosso. Lasciar sedimentare per 12 ore circa, filtrare e portare il filtrato ad 1 litro con acqua.

6.5 Soluzione di fenolftaleina

Sciogliere 50 g di fenolftaleina in 500 mL di etanolo al 95% e portare ad 1 litro con acqua. Aggiungere, goccia a goccia, una soluzione di idrossido di sodio 0,01 M, fino alla comparsa di un colore rosa pallido.

6.6 Soluzione di perossido di idrogeno al 30%

6.7 Soluzione di acido solforico circa 0,5 M

Aggiungere molto lentamente e sotto raffreddamento 28 mL di acido solforico (H_2SO_4) (d=1,84) a 500 mL di acqua. Dopo raffreddamento diluire ad 1 litro con acqua.

6.8 Soluzione di idrossido di sodio circa 1 M

Sciogliere 40 g di idrossido di sodio (NaOH) in acqua e diluire ad 1 litro.

6.9 Sospensione di idrossido di alluminio

Sciogliere 125 g di allume potassico ($AlK(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$) in 1000 mL di acqua. Scaldare a 60°C e aggiungere 55 mL di soluzione acquosa concentrata di ammoniaca, lentamente e agitando. Lasciare a riposo per circa 1 ora, quindi travasare la sospensione in una bottiglia e lavare ripetutamente il precipitato con acqua per decantazione, fino a che le acque di lavaggio siano esenti da cloruri.

6.10 Carbone attivo

7. Procedimento

7.1 Pretrattamento

La soluzione da titolare deve essere limpida, incolore e priva delle sostanze interferenti.
Portare 100 mL di campione decantato (o un'aliquota misurata diluita a 100) a pH 8,3 con NaOH 1 M (6.8) o H_2SO_4 0,5 M (6.7) in presenza di fenolftaleina. Se necessario filtrare at-

traverso membrana filtrante da 0,45 µm. Lavare il precipitato più volte con 2÷5 mL di acqua. Sul filtrato determinare i cloruri.
Se sono presenti sostanze riducenti, quali solfiti, solfuri, tiosolfati, ecc., portare 100 mL di campione (o un'aliquota) a pH 8,3 in presenza di fenolftaleina, eventualmente filtrare e lavare il precipitato. Aggiungere 1 o più mL di soluzione di H_2O_2 (6.6), portare all'ebollizione per pochi minuti e verificare il pH alla fenolftaleina (6.5). Se si forma un precipitato filtrare, lavare il precipitato e sul filtrato determinare i cloruri.
Se il campione, dopo correzione del pH e dopo filtrazione su membrana, rimane torbido e/o colorato, aggiungere a 100 mL di campione (o a un'aliquota) - portato a pH 8,3 - 3 mL di sospensione di idrossido di alluminio (6.9).
Agitare, lasciar decantare, filtrare, lavare il precipitato e sul filtrato determinare i cloruri.
Se il campione pretrattato (o aliquota) da sottoporre alla titolazione è ancora colorato, aggiungere 5 g di carbone attivo, filtrare, lavare il filtro e sul filtrato determinare i cloruri.

7.2 Titolazione

Prelevare 100 mL esatti di campione, oppure un volume inferiore esattamente noto, che viene diluito a 100 mL a seconda del contenuto di ione cloruro: in genere si preleva una quantità tale che il contenuto di cloruro non superi 70 mg.
Qualora si voglia controllare se la concentrazione di cloruri nel campione sia superiore o inferiore a 1200 mg/L, conviene prelevare un'aliquota di 30 mL.
Verificare che il campione si trovi intorno a pH 8. Se così non fosse, aggiustare il valore mediante acido solforico 0,5 M (6.7) o idrossido di sodio 1 M (6.8).
Aggiungere 1 mL di soluzione di cromato di potassio (6.4) e titolare con nitrato d'argento 0,1 N (6.2), fino a viraggio rosso persistente.
E indispensabile eseguire, nelle stesse condizioni, una prova in bianco su un'aliquota di 100 mL di acqua, trattata in modo analogo al campione.

8. Calcoli

La concentrazione dello ione cloruro è espressa dalla formula:

$$Cl^-(mg/L) = \frac{(a-b)\cdot N\cdot 35{,}45\cdot 1000}{V}$$

dove:
a = volume (mL) di soluzione di riferimento di nitrato d'argento (6.2) usata per titolare il campione;
b = volume (mL) di soluzione di riferimento di nitrato d'argento (6.2) usata per titolare il bianco;
N = normalità della soluzione di riferimento di nitrato d'argento (6.2);
V = volume (mL) di campione d'acqua prelevato;
35,45 = peso equivalente del cloruro.

Se per la titolazione occorrono più di 10 mL della soluzione di riferimento 0,1 N di nitrato d'argento, la concentrazione dei cloruri nel campione è virtualmente superiore a 1200 mg/L, qualora si siano prelevati 30 mL di campione.

9. Qualità del dato

Prove effettuate (n=7) da un singolo laboratorio su soluzioni sintetiche di acqua deionizzata contenenti 250 mg/L di cloruro hanno fornito un valore del coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100, pari al 4% e un'accuratezza del 2%.

METODO A2 - Titolazione mercurimetrica con indicatore

1. Principio del metodo

Titolazione dello ione cloruro, nell'intervallo di pH 2,3÷2,8, con una soluzione di nitrato di mercurio (II), in presenza d'indicatore misto difenilcarbazone-blu di bromofenolo. La fine della titolazione è data dalla comparsa di una colorazione porpora, dovuta alla formazione del complesso che l'eccesso di ioni mercurio (II) dà con il difenilcarbazone.

2. Campo di applicazione

Il presente metodo, applicabile alle acque di scarico, superficiali e sotterranee, consente un apprezzamento del punto finale migliore che nel metodo A e si presta meglio per acque a basso contenuto di cloruri. Il fatto inoltre che si operi in ambiente acido per acido nitrico (pH 2,3÷2,8) limita di molto il numero dei cationi che possono dare interferenza per formazione di precipitati a pH più elevati (vedi Capitolo 3).
Anche in questo metodo l'apprezzamento del viraggio può essere reso difficoltoso dalla presenza di colore o di torbidità, così come specie chimiche, che possono reagire con lo ione mercurio (II) o con l'indicatore, possono rendere inattuabile la titolazione, a seconda della concentrazione.
Nel campione sottoposto alla titolazione con $Hg(NO_3)_2$ 0,1 N (come indicato nel metodo) si possono dosare da 3,5 a 25 mg di cloruri (1÷7 mL di titolante), corrispondenti a 70÷500 mg/L se si usano 50 mL di acqua da analizzare; la titolazione è ancora possibile con una soluzione 0,0141 N di nitrato di mercurio (II) con ottimo apprezzamento del viraggio anche per 0,25 mg di cloruri in 50 mL, ponendo molta attenzione al controllo del pH a 2,5±0,1.

3. Interferenze e cause di errore

Bromuri, ioduri, cianuri e tiocianati vengono ugualmente titolati dal nitrato di mercurio (II).
Gli ioni cromato, sali di ferro (III) e solfiti interferiscono, qualora siano presenti a concentrazioni superiori a 10 mg/L. Non interferiscono: rame fino a 50 mg/L; piombo, nichel, zinco, ferro (II), cobalto, cadmio e cromo (III) fino a 100 mg/L; solfato, fosfato, magnesio, calcio e alluminio fino a 1000 mg/L.
L'eventuale colorazione o torbidità del campione deve essere eliminata.

4. Campionamento e conservazione del campione

Vedi Capitolo 4 metodo A1.

5. Apparecchiature

Normale attrezzatura di laboratorio e buretta graduata di volume opportuno.

6. Reattivi

Si debbono utilizzare solo reattivi di grado analitico.

6.1 Acqua esente da cloruri

Per la preparazione dei reattivi è opportuno impiegare acqua bidistillata o deionizzata e distillata.

6.2 Soluzione di riferimento di nitrato di mercurio (II) 0,1 N

Sciogliere circa 17 g di nitrato di mercurio (II) ($Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$) in 900 mL di acqua contenente 5 mL di HNO_3 concentrato e portare ad 1 litro. L'esatta concentrazione di questa soluzione deve essere controllata, anche se si sono impiegate fiale certificate pronte per la diluizione, titolando con la stessa un'aliquota di 20,0 mL, diluita a 50 mL con acqua, della soluzione di riferimento di cloruro di potassio 0,1 N (6.3), secondo le modalità descritte al Paragrafo 7.2. Tale controllo va effettuato almeno in doppio, prima di iniziare la serie di analisi. Lo scarto tra due prove non deve superare 0,2 mL.
Il calcolo della normalità esatta N della soluzione si effettua nel modo seguente:

$$N = \frac{N_1 \cdot 20}{V}$$

dove:
N_1 = normalità della soluzione di cloruro di potassio (6.3);
V = volume (mL) della soluzione di $Hg(NO_3)_2 \cdot H_2O$ impiegato nella titolazione e corretto del bianco.

La soluzione deve essere conservata in recipiente di vetro scuro.

6.3 Soluzione di riferimento di cloruro di potassio 0,1 N

Trasferire 7,4501 g di cloruro di potassio (KCl), previamente essiccato fino a peso costante in stufa a 180°C e raffreddato in essiccatore, in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua. Si consiglia di rinnovare la soluzione ogni mese.

6.4 Indicatore misto

Sciogliere 0,5 g di difenilcarbazone e 0,05 g di bromofenolo in 75 mL di etanolo o isopropanolo al 95% e diluire a 100 mL con lo stesso solvente. Conservare in bottiglia scura per non più di sei mesi.

6.5 Soluzione di acido nitrico circa 0,1 M

Diluire 6,7 mL di acido nitrico (HNO_3) concentrato (d=1,40) in un matraccio tarato da 1000 mL con acqua.

6.6 Soluzione di perossido di idrogeno al 30%

7. Procedimento

7.1 Pretrattamento

Procedere come indicato al Paragrafo 7.1 del metodo A1.

7.2 Titolazione

Prelevare 100 mL esatti di campione oppure un volume inferiore esattamente noto (a seconda del contenuto di ioni cloruro), che viene ugualmente diluito a 100 mL con acqua; il contenuto di ioni cloruro non deve superare i 25 mg. Aggiungere 0,5 mL di indicatore misto (6.4), agitare bene, quindi aggiustare il pH, versando goccia a goccia HNO_3 0,1 M (6.5) sino al viraggio del colore porpora al giallo.
Titolare con la soluzione 0,1 N di nitrato di mercurio (II) (6.2) fino al colore porpora scuro permanente. Effettuare una prova in bianco su un ugual volume di acqua, trattato analogamente al campione.

8. Calcoli

La concentrazione dello ione cloruro è espressa dalla formula:

$$Cl^{-}(mg/L) = \frac{(a-b)\cdot N\cdot 35{,}45\cdot 1000}{V}$$

dove:
a = volume (mL) di soluzione di riferimento di nitrato di mercurio (6.2) usata per titolare il campione;
b = volume (mL) di soluzione di riferimento di nitrato di mercurio (6.2) usata per titolare il bianco;
N = normalità della soluzione di riferimento di nitrato di mercurio (6.2);
V = volume (mL) di campione d'acqua prelevato;
35,45 = peso equivalente del cloruro.

9. Qualità del dato

Prove effettuate (n=6) da un singolo laboratorio su soluzioni sintetiche di acqua deionizzata contenenti 250 mg/L di cloruro hanno fornito un valore del coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100, pari al 3% e un'accuratezza del 3%.

METODO B - Titolazione argentometrica per via potenziometrica

1. Principio del metodo

Titolazione potenziometrica dello ione cloruro con una soluzione titolata di nitrato d'argento in ambiente acido. La variazione del potenziale è seguita con la coppia elettrodo d'argento (elettrodo indicatore) ed elettrodo a calomelano saturo (elettrodo di riferimento).

2. Campo di applicazione

Questo metodo, applicabile alle acque di scarico, superficiali e sotterranee, consente la titolazione argentometrica diretta, in ambiente acido per acido nitrico, in modo molto accurato anche di piccole quantità di cloruri, in quanto si possono impiegare soluzioni di $AgNO_3$ anche 0,001 N (1 mL per 50 mL di campione corrisponde a 0,7 mg/L di cloruri) poichè il punto finale della titolazione può essere individuato in modo obiettivo o con il calcolo o per via grafica o direttamente per via strumentale anche automatizzata.
Il metodo è applicabile a soluzioni colorate e/o torbide e non ha molte interferenze se non si tratta di sistemi fortemente ossidanti o fortemente riducenti o complessanti o che precipitano lo ione Ag(I) in ambiente acido; in alcuni casi il metodo potenziometrico può consentire la titolazione insieme al cloruro di altri anioni (ad es. I^-, Br^-) presenti nella stessa soluzione in rapporti di concentrazione opportune.

3. Interferenze e cause di errore

Il metodo consente, in certe condizioni, di dosare simultaneamente e separatamente gli ioni bromuro e ioduro.
Tuttavia si può ovviare all'interferenza dovuta ad altri ioni, quali cianuro, solfuro, tiocianato, solfito, ammonio e ferro (III) come descritto al Paragrafo 7.1. La presenza di sostanze fortemente ossidanti può nuocere al funzionamento dell'elettrodo indicatore, in quanto può dar luogo al deposito di un prodotto di ossidazione dell'argento sull'elettrodo stesso.

4. Campionamento e conservazione del campione

Vedi Capitolo 4 metodo A1.

5. Apparecchiature

5.1 Apparecchiatura per potenziometria

5.1.1 Potenziometro, sensibilità 2 mV (potenziale da -500 mV a +500 mV)

5.1.2 Elettrodo d'argento

L'elettrodo deve essere pulito con carta da filtro, acido nitrico 1 M e acqua distillata prima di ogni titolazione.

5.1.3 Elettrodo a calomelano saturo

5.1.4 Ponte salino

Il ponte è costituito da agar-agar saturo di nitrato di potassio, oppure da soluzione satura di nitrato di potassio, collegata con l'elettrodo a calomelano. È munito alle sue estremità di diaframmi porosi.

5.1.5 Agitatore elettromagnetico, con barretta rivestita di teflon

5.2 Normale attrezzatura di laboratorio e buretta graduata di volume opportuno.

6. Reattivi

Si debbono utilizzare solo reattivi di grado analitico.

6.1 Acqua esente da cloruri

Per la preparazione dei reattivi è opportuno impiegare acqua distillata o deionizzata e distillata.

6.2 Soluzione di riferimento di nitrato d'argento 0,1 N

Sciogliere circa 17 g di nitrato d'argento ($AgNO_3$) in acqua e trasferirli quantitativamente in un matraccio tarato da 1000 mL. Portare a volume con acqua, avendo cura di ben omogeneizzare la soluzione.
L'esatta concentrazione di questa soluzione deve essere controllata, anche se si sono impiegate fiale certificate pronte per la diluizione, effettuando la titolazione potenziometrica della soluzione di riferimento di cloruro di potassio 0,1 N (6.3) secondo le modalità descritte al Paragrafo 7.2.

6.3 Soluzione di riferimento di cloruro di potassio 0,1 N

Trasferire 7,4501 g di cloruro di potassio (KCl), previamente essiccato fino a peso costante in stufa a 180°C e raffreddato in essiccatore, in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua. Si consiglia di rinnovare la soluzione ogni mese.

6.4 Acido nitrico concentrato (d=1,40)

6.5 Nitrato di potassio, soluzione satura a temperatura ambiente.

6.6 Agar-agar esente da cloruri

7. Procedimento

7.1 Pretrattamento

Mediante opportuno pretrattamento possono essere eliminate le interferenze descritte al Capitolo 3.
Tutti gli alogenuri, fluoruro escluso, possono essere dosati contemporaneamente. Se le concentrazioni di ciascuno sono simili è possibile determinare nell'ordine, sul medesimo campione, ioduri, bromuri e cloruri, tenendo conto dei differenti valori dei prodotti di solubilità e quindi dei differenti potenziali dell'elettrodo indicatore corrispondenti alla fine di ogni titolazione. Nel caso in cui i bromuri e/o gli ioduri siano in eccesso rispetto ai cloruri, essi possono essere rimossi preliminarmente, per mezzo di un trattamento ossidante, ad esempio con H_2O_2, all'ebollizione in HNO_3 diluito, seguito da un'estrazione dell'alogeno formatosi con appropriato solvente (ad. es., solfuro di carbonio). La rimozione di sostanze che potrebbero ossidare l'elettrodo d'argento può essere effettuata mediante pretrattamento con acido ascorbico oppure con altra sostanza riducente che non interferisca.
L'interferenza dei sali d'ammonio e di ferro può essere prevenuta con un doppio trattamento, in ambiente alcalino, in presenza di H_2O_2 e all'ebollizione, seguito da un'eventuale filtrazione e acidificazione del filtrato con acido nitrico.
L'interferenza dei cianuri, tiocianati e solfuri viene ugualmente eliminata con trattamento ossidante in ambiente alcalino, mediante ebollizione prolungata.

7.2 Controllo del titolo della soluzione di riferimento di nitrato d'argento 0,1 N

Prelevare 5,00 e 10,00 mL rispettivamente della soluzione di KCl 0,1 N (6.3) e trasferirli in due beaker da 250 mL. Qualora si preveda di eseguire un pretrattamento del campione, occorre effettuare la standardizzazione in presenza delle stesse quantità di tutti i reattivi utilizzati in tale operazione. Trasferire quindi in ogni beaker 2 mL di HNO_3 (6.4), oppure un volume sufficiente a neutralizzare la soluzione più 2 mL di HNO_3 in eccesso, e una quantità d'acqua sufficiente a portare il volume a 100 mL.
Introdurre nel beaker la barretta magnetica, porre il beaker sull'agitatore e iniziare l'agitazione. Immergere l'elettrodo d'argento (5.1.2) nella soluzione e collegare ad essa l'elettrodo di riferimento (5.1.3) tramite ponte salino (5.1.4). Misurare il potenziale, mediante apparecchiatura potenziometrica (5.1.1), dopo averne verificato lo zero.
Aggiungere rispettivamente 4 e 9 mL della soluzione di $AgNO_3$ 0,1 N (6.2), continuare ad aggiungere la soluzione di $AgNO_3$ per aliquote successive uguali a 0,1 mL o meglio 0,05 mL e misurare il potenziale avendo cura di attendere, dopo ogni aggiunta, la sua stabilizzazione.
Scrivere nelle prime due colonne di una tabella (vedere allegato) i volumi mano a mano aggiunti ed i corrispondenti potenziali. In una terza colonna registrare gli incrementi successivi del potenziale E, Δ_1E. Su una quarta colonna annotare le differenze successive (Δ_2E), positive o negative, tra gli incrementi di potenziale Δ_1E. La fine della titolazione corrisponde all'aggiunta di $AgNO_3$ che dà il valore massimo di Δ_1E.
Per calcolare il volume esatto V_{eq}, della soluzione di $AgNO_3$, corrispondente alla fine della titolazione, si applica la formula:

$$V_{eq} = V_0 + V_1 \cdot \frac{p}{P}$$

dove:
V_0 = volume (mL) della soluzione di $AgNO_3$, immediatamente inferiore all'aggiunta che fornisce l'incremento massimo Δ_1E;
V_1 = volume (mL) della soluzione di $AgNO_3$, corrispondente all'ultima aliquota aggiunta;
p = ultimo valore di Δ_2E con il segno +;

P = somma dei valori assoluti dell'ultimo Δ_2E con il segno + e del primo Δ_2E con il segno - (vedere l'esempio riportato in Appendice, in cui le aggiunte di titolante, $AgNO_3$ 0,01 N, avvengono per aliquote successive di 0,1 mL).

7.2.1 Calcolo del titolo della soluzione di riferimento di $AgNO_3$

Il titolo della soluzione di $AgNO_3$, espresso in normalità, è dato dalla formula:

$$N = N_1 \cdot \frac{5}{V_2 - V_3}$$

dove:

N_1 = normalità della soluzione di riferimento di KCl (6.3);
V_2 = valore (mL) di V_{eq} corrispondente alla titolazione di 10 mL della soluzione di riferimento di KCl;
V_3 = valore (mL) di V_{eq} corrispondente alla titolazione di 5 mL della soluzione di riferimento di KCl;
5 = differenza (mL) tra i due volumi prelevati della soluzione di riferimento di KCl.

7.3 Calcolo del valore del bianco

Il valore del bianco dei reattivi, b, è dato, in mL, dalla formula:

$$b = 2V_3 - V_2$$

dove V_2 e V_3 hanno lo stesso significato indicato al Sottoparagrafo 7.2.1.

7.4 Titolazione del campione

Titolare il campione acquoso, che non deve contenere più di 35 mg di ione cloruro, con la soluzione standard di $AgNO_3$ 0,1 N, secondo le modalità descritte al Paragrafo (7.2), ma senza tener conto dell'istruzione relativa all'aggiunta di 4 e 9 mL della soluzione di $AgNO_3$.

8. Calcoli

Vedi Capitolo 8 metodo A1.

9. Qualità del dato

Prove effettuate (n=5) da un singolo laboratorio su soluzioni sintetiche di acqua deionizzata contenenti 5 mg/L di cloruro hanno fornito un valore del coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100, pari al 2,5% e un'accuratezza del 3%.
La precisione del metodo può essere aumentata riportando i dati della titolazione secondo il metodo di Gran o ricorrendo alla potenziometria derivata.

APPENDICE

Esempio di calcolo di V_{eq}

elettrodo indicatore argento
elettrodo di riferimento calomelano saturo

Volume soluzione di $AgNO_3$ 0,01 N (mL)	Potenziale (mV)	Δ_1E (mV)	Δ_2E (mV)
4,80	176		
		35	
4,90	211		+37
		72	
5,00	283		-49
		23	
5,10	306		-10
		13	
5,20	319		

$$V_{eq} = 4{,}9 + 0{,}1 \frac{37}{37+39} = 4{,}943$$

Dispositivi costituiti da un sistema automatico di erogazione del titolante, titolatore potenziometrico e "data handling" automatizzato possono ridurre i tempi di analisi e facilitare il calcolo del volume equivalente.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1992): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA).

ASTM (1974) *«Book of Standard»,* Part 31, D 512-67 A.

CHARLOT G. (1961): "*Les méthodes della Chimie Analytique, Analyse Quantitative Minérale*", Masson et Cie, Paris, p. 392.

IRSA (1986): "Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **75**, 141-142.

KOLTHOFF I.M., SANDELL E.B., MEEHAN E.J. & BRUCKENSTEIN S. (1974): "*Analisi Chimica Quantitativa*", Piccin Editore, Padova, p. 839.

VOGEL A.I. (1961): "*A text-book of Quantitative Inorganic Analysis including Elementary Instrumental Analysis*", Longmans, Green and Co. Ltd., London, **73**, 934-950.

4100. Fluoruro

I minerali più abbondanti contenenti fluoro sono la fluorite (CaF_2), la criolite (Na_3AlF_6) e l'apatite ($3Ca_3(PO_4)_2Ca(F,Cl)_2$). Lo ione fluoruro mostra elevate concentrazioni nelle rocce vulcaniche, che rappresentano un'importante sorgente di fluoruri per le acque naturali.
La fluorite rappresenta la materia prima per la produzione dell'acido fluoridrico; minerali fluorurati trovano impiego nella produzione dell'acciaio, dell'alluminio e del magnesio, nell'industria delle ceramiche e dei vetri.
Nelle acque dolci lo ione fluoruro è presente prevalentemente come anione libero, mentre nelle acque marine il 51% del fluoro è nella forma anionica, il 47% come MgF^+ e solo il 2% come CaF^+.
La maggior parte delle acque dolci presenta concentrazioni di fluoruri inferiori a 0,2 mg/L; concentrazioni elevate (0,7-1,7 mg/L) si possono riscontrare in acque drenanti bacini vulcanici.
Per la determinazione dei fluoruri vengono proposti due metodi, il primo spettrofotometrico utilizza la formazione a pH controllato di un complesso blu fra il fluoruro e il cerio-alizarin-complessone e il secondo potenziometrico impiega invece un elettrodo indicatore del tipo a membrana, sensibile allo ione fluoruro.

METODO A - Determinazione spettrofotometrica al cerio-alizarin-complessone

1. Principio del metodo

Lo ione fluoruro reagisce con il prodotto della reazione fra l'alizarin-complessone ed il nitrato di cerio (III) con formazione di un complesso di colore blu misurabile spettrofometricamente alla lunghezza d'onda di 620 nm; per il fluoruro totale solubile la determinazione deve essere preceduta dalla distillazione.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ad acque naturali, di scarico e sotterranee per valori di concentrazione superiori a 0,05 mg/L.

3. Interferenze e cause di errore

Interferiscono negativamente gli ioni ortofosfato e solfato se presenti in quantità dell'ordine dei milligrammi nel campione da analizzare; nella maggior parte dei casi si può superare tale interferenza impiegando quantità di campione sufficientemente piccole da escludere tale disturbo.
L'interferenza di nitriti e di solfiti può essere eliminata aggiungendo al campione rispettivamente acido solfammico e acqua ossigenata. Alcuni metalli (Al, Zr, Be) possono formare con lo ione fluoruro complessi assai stabili sottraendo così fluoruro, in misura più o meno grande, alla determinazione analitica.
Si può ovviare a tale inconveniente utilizzando 1'8-idrossichinolina che forma con questi metalli complessi più stabili di quelli con il fluoruro, estraibili con cloroformio. Quest'ultimo procedimento può essere evitato nel caso di acque contenenti Al, Zr, Be in quantità <0,2 mg/L.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".

5. Apparecchiature

5.1 Apparecchiatura di distillazione

La Fig. 1 mostra un esempio di apparecchio di distillazione.

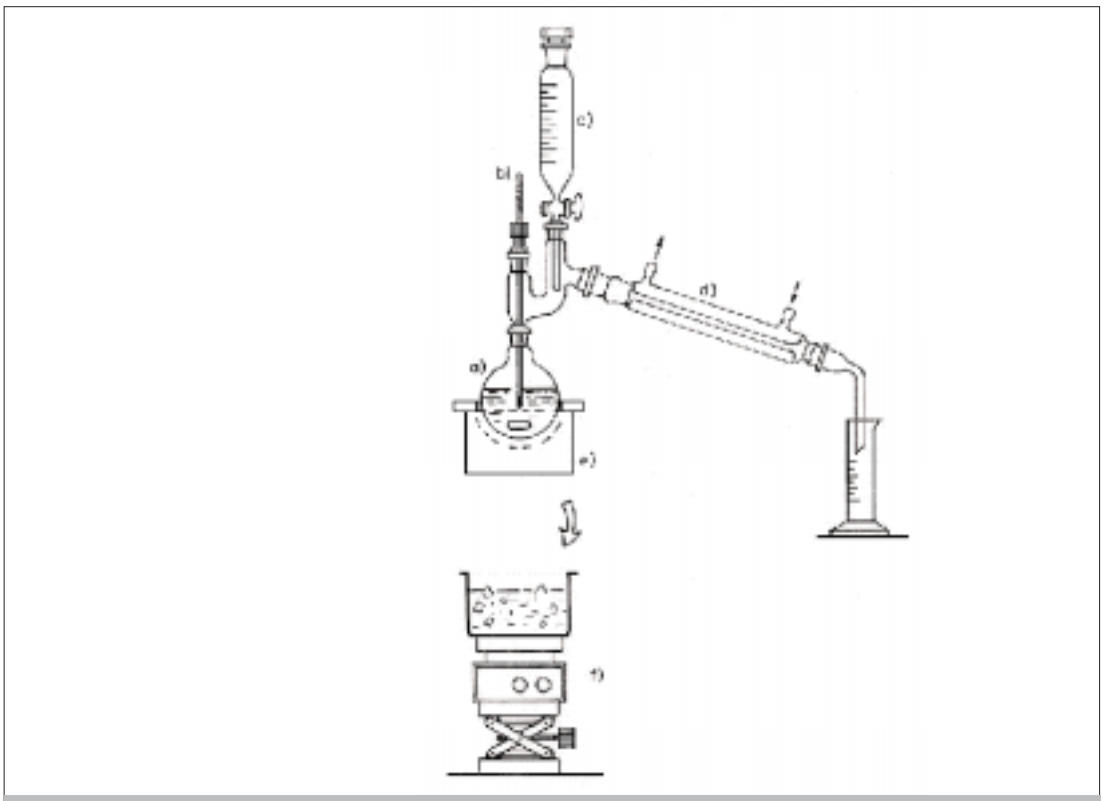


Figura 1: Apparecchio per la distillazione dei fluoruri. a) pallone di distillazione; b) termometro; c) imbuto gocciolatore; d) refrigerante; e) sorgente di calore; f) agitatore magnetico.

5.2 *Spettrofotometro* per misure di assorbanza a 620 nm, con celle aventi cammino ottico di 1 cm.

6. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e l'acqua indicata nel seguito deve essere distillata e deionizzata.

6.1 Soluzione concentrata di fluoruro (1 mL=0,1 mg di F^-)

Sciogliere 221,1 mg di fluoruro di sodio anidro (NaF), seccato a 105°C per due ore e raffreddato in essiccatore, in acqua e diluire a 1000 mL. La soluzione deve essere conservata in bottiglie di teflon o di polietilene.

6.1.1 Soluzione diluita di fluoruro (1 mL=0,001 mg di F^-)

Introdurre 10 mL di soluzione concentrata (6.1) di fluoruro in un matraccio tarato da 1000 mL, e portare a volume con acqua. Preparare questa soluzione al momento dell'uso.

6.2 Soluzione di alizarin-complessone 0,0005 M

Porre 192,5 mg di alizarin-complessone (acido alizarin-3-metilammino-N, N-diacetico, P.M. 385) in 50 mL di acqua e scioglierli utilizzando 4 mL di NaOH 1 M. Diluire la soluzione a circa 900 mL e aggiustare il pH al valore 5,0 con circa 4 mL di HCl 1 N; portare poi a 1000 mL con acqua e conservare la soluzione al buio.

6.3 Soluzione di nitrato di cerio (III) 0,005 M

Sciogliere 2,171 g di nitrato di cerio ($Ce(NO_3)_3 \cdot 6H_2O$, P.M. 434,2) in 1000 mL di acqua, aggiungendo, prima di portare a volume, 2,5 mg di cloridrato di idrossilammina ($NH_2OH \cdot HCl$) quale stabilizzante.

6.4 Tampone acetato a pH 4,3

Mescolare 240 mL di una soluzione 1 M di acido acetico (6.11) e 75 mL di una soluzione di NaOH 1 M (6.9) e portare a 1000 mL con acqua. Controllare il pH.

6.5 Granuli di pomice lavati a caldo successivamente con HCl, HNO_3 e H_2SO_4, poi con acqua ed etanolo al 95%, essiccati in stufa a 150°C per due ore.

6.6 Acetone

6.7 Soluzione di fenolftaleina in etanolo al 95% (1 g/L)

Sciogliere 0,1 g di fenolftaleina ($C_{20}H_{14}O_4$) in 100 mL di etanolo al 95%.

6.8 Acido solforico concentrato (d=1,84)

6.9 Soluzione di idrossido di sodio 0,1 M

Sciogliere 4 g di idrossido di sodio (NaOH) in 1000 mL di acqua.

6.10 Miscela di reattivi

Immediatamente prima dell'uso introdurre, in un matraccio tarato da 250 mL, 20 mL della soluzione tampone (6.4), 50 mL della soluzione di nitrato di cerio (III) (6.3), 100 mL di acetone (6.6) e 50 mL di soluzione di alizarin-complessone (6.2); raffreddare la miscela a 20°C e portare a volume con acqua, omogeneizzando.

6.11 Soluzione di acido acetico 1 M

Sciogliere 57,2 mL di acido acetico glaciale in acqua e portare a 1000 mL.

7. Procedimento

7.1 Preconcentrazione e trattamento del campione

Prelevare un'aliquota di campione che contenga in assoluto non più di 1 mg di F^-.
In presenza di basse concentrazioni di fluoruro, per rientrare nei limiti sopraindicati, occorre

concentrare un volume maggiore di campione dopo averlo alcalinizzato leggermente con una soluzione di idrossido di sodio (6.9) in presenza di fenolftaleina (6.7).
Nel caso in cui il campione contenga cloruri a concentrazione superiore ad 1 g/L occorre aggiungere solfato di argento (5 mg di sale per 1 mg di Cl^-).
Il campione, soggetto o no ai trattamenti di cui sopra, viene trasferito alla successiva fase di distillazione.

7.2 Distillazione

Per eliminare le eventuali impurezze di fluoruro presenti nell'apparecchiatura (Fig. 1) e per normalizzare le condizioni operative, introdurre nel pallone (a) 400 mL di acqua e, attraverso l'imbuto gocciolatore (c), lentamente 200 mL di acido solforico concentrato (6.8). Introdurre anche una barretta magnetica teflonata di circa cm 2. La distillazione va fatta in presenza di alcuni granuli di pomice (0,8 g circa) (6.5).
Preliminarmente disporre sotto il pallone l'agitatore elettromagnetico provvisto di vaschetta di refrigerazione (f). Terminata l'operazione, sostituire il sistema di refrigerazione-agitazione (f) con il mantello riscaldante (e) ed iniziare il riscaldamento lentamente e gradualmente finché la temperatura del liquido all'interno del pallone raggiunga esattamente i 180°C. Scartare il distillato.
Allontanare il mantello riscaldante ed inserire sotto il pallone il sistema refrigerante munito di agitatore (f) (conviene aggiungere all'acqua della vaschetta alcuni pezzi di ghiaccio).
Quando la temperatura all'interno del pallone è scesa sotto i 30°C, aggiungere, mantenendo l'agitazione all'interno del pallone, gocciolando attraverso l'imbuto gocciolatore (c), il campione (7.1) (ad es. 300 mL).
Sostituire nuovamente il sistema di refrigerazione/agitazione (f) con il mantello niscaldante ed iniziare la distillazione lentamente, finchè la temperatura del liquido all'interno del pallone non raggiunga i 180°C.
Per evitare un eccessivo passaggio di acido solforico nel distillato evitare che la temperatura superi i 180°C. Il distillato viene raccolto in un cilindro graduato e sottoposto alle successive operazioni.
Dopo la distillazione di campioni ad alto tenore di fluoruro la distillazione preliminare, prima descritta, è ancor più indispensabile prima che siano introdotti altri campioni con un contenuto di fluoruro inferiore.

7.3 Determinazione

In un pallone tarato da 50 mL prelevare un'aliquota di distillato (7.2) (volume massimo 20 mL contenenti al massimo 20 μg di F^-), aggiungere 0,1 mL di fenolftaleina (6.7) e neutralizzare la soluzione con NaOH 0,1 M (6.9); aggiungere 25 mL di "miscela di reattivi" (6.10), portare a volume e omogeneizzare.
Dopo 20 minuti leggere l'assorbanza della soluzione a 620 nm in celle con cammino ottico di 1 cm. Dal grafico di taratura (7.4) risalire al contenuto in fluoruro del campione.

7.4 Taratura

In una serie di cinque palloni tarati da 50 mL introdurre, ad esempio, 5,0 mL; 10,0 mL; 15,0 mL e 20,0 mL di soluzione diluita di fluoruro (6.1.1) (le soluzioni contengono rispettivamente 5,0 μg; 10,0 μg; 15,0 μg e 20,0 μg di fluoruro) e aggiungere la quantità di acqua necessaria per portare il volume a 20 mL. Preparare inoltre un bianco con 20 mL di acqua deionizzata. Procedere come descritto in (7.3).
Il grafico di taratura viene quindi costruito riportando l'assorbanza a 620 nm in funzione dei μg di fluoruro. La taratura va ripetuta ogni volta che vengono rinnovate le soluzioni (6.2) e (6.3).

8. Calcoli

$$F^-(mg/L) = \frac{g \cdot b \cdot f}{a \cdot c}$$

dove:
a = volume (mL) del campione tal quale o concentrato, sottoposto a distillazione;
b = volume (mL) del distillato raccolto;
c = volume (mL) del distillato prelevato per la misura;
g = fluoruri (µg) ricavati dal grafico di taratura;
f = fattore che tiene conto dell'eventuale operazione di concentrazione iniziale del campione.

9. Qualità del dato

Prove effettuate (n=6) da un singolo laboratorio su soluzioni di acqua deionizzata aventi una concentrazione di fluoruro di 0,4 mg/L hanno permesso di calcolare una ripetibilità, espressa come coefficiente di variazione, [CV = (scarto tipo/valore medio)·100], del 10% e un'accuratezza del 4%.
Va tenuto presente che la precisione e l'accuratezza di un metodo generalmente peggiorano all'aumentare della complessità della matrice.

METODO B - Determinazione potenziometrica

1. Principio del metodo

Il metodo si basa sulla misura della f.e.m. di una cella costituita da un elettrodo di riferimento – il cui potenziale è pertanto rigorosamente noto e riproducibile – e da un elettrodo indicatore dello ione fluoruro, entrambi in contatto con una soluzione nella quale sia presente lo ione da determinare. L'elettrodo indicatore è del tipo a membrana a cristallo singolo di fluoruro di lantanio. Dalla misura della f.e.m., conoscendo il valore del potenziale dell'elettrodo di riferimento impiegato, si può calcolare il potenziale dell'elettrodo indicatore e da questo l'attività e la concentrazione dello ione fluoruro, in quanto correlate al valore del potenziale dall'equazione:

$$E = E^* - 2{,}3\frac{RT}{F}\log a_{F^-} = E^* - 2{,}3\frac{RT}{F}\log C_{F^-} f_{F^-}$$

dove:
E = Potenziale dell'elettrodo indicatore;
E* = valore costante che deriva dalla costituzione dell'elettrodo in soluzioni ad attività nota di F^-;
R = Costante dei gas;
T = Temperatura in gradi Kelvin;
F = Faraday.

$$2{,}3\frac{RT}{F}\,(\text{a } 25°C) = 59{,}16 \text{ mV}$$

a_{F^-}, c_{F^-}, f_{F^-} sono rispettivamente l'attività, la concentrazione ed il coefficiente di attività dello ione fluoruro nella soluzione in esame.
Poiché la determinazione della concentrazione richiede la conoscenza del coefficiente di attività, si opera con il metodo della retta di taratura determinando la f.e.m. e quindi il potenziale dell'elettrodo indicatore in soluzioni a concentrazione variabile di fluoruro e a forza ionica costante pari a quella della soluzione in esame. A tal fine la soluzione a concentrazione incognita, ed alcune soluzioni di fluoruro a titolo noto vengono diluite (1+1) con una solu-

zione tampone (pH=5,0-5,5) ad elevata forza ionica, in modo da livellare eventuali differenze fra la forza ionica del campione e delle soluzioni di riferimento, dovute alla mancata conoscenza, della forza ionica del primo.
Tale operazione ha anche il vantaggio di utilizzare le condizioni di pH ottimali per la determinazione ed inoltre, in relazione alla composizione della soluzione tampone, di ridurre le difficoltà connesse alla possibile complessazione dello ione fluoruro da parte di ioni metallici che lo trasformano in specie rispetto alle quali l'elettrodo a membrana non risulta più indicatore.
Nel caso di scarichi industriali fortemente basici (pH=12) è necessario sostituire una parte del volume della soluzione tampone con una uguale aliquota di soluzione di HCl 1 N, aggiungendo al volume "v" di campione HCl fino a pH=8 e portando al volume finale "2 v" con la soluzione tampone.

2. Campo di applicazione

Il metodo si applica alla determinazione dei fluoruri nelle acque naturali e di scarico nell'intervallo di concentrazione 0,1-1000 mg/L.

3. Interferenze e cause di errore

Nel caso si ipotizzi la presenza dello ione fluoborato (o introdotto come tale o formatosi) e si voglia determinare il fluoruro totale, il campione prima dell'analisi deve essere distillato per consentire la trasformazione del fluoborato in fluoruro.
Lo stesso accorgimento deve impiegarsi nel caso della presenza di composti fluoro-organici o comunque quando si abbiano dubbi o notizie non complete sulla forma in cui il fluoruro è presente, tenendo conto del fatto che il tampone di forza ionica, di cui è stato detto e che verrà illustrato più sotto, preserva soltanto dalla complessazione del fluoruro da parte di cationi polivalenti come Al (III), Fe (III), e dalla interferenza di fosfati e Si (IV) nonchè, di polifosfati e Cr (III), purchè questi siano presenti a concentrazione minore di 500 mg/L ed i fluoruri siano invece presenti a concentrazioni superiori a 5 g/L.
Se queste due condizioni non sono rispettate, entrambe le interferenze producono valori sperimentali in difetto rispetto ai valori teorici.
I tensioattivi cationici, anionici e non ionici se presenti rispettivamente a concentrazioni maggiori di 50, 400 e 1000 mg/L interferiscono producendo valori in difetto di fluoruri.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il prelievo e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".

5. Apparecchiature

5.1 *Elettrodo selettivo* per lo ione fluoruro disponibile in commercio (*).

5.2 *Elettrodo di riferimento*, a calomelano o ad Ag/AgCl del tipo a fibra con pareti di materiale diverso dal vetro (*).

5.3 *Agitatore magnetico* con barretta ricoperta di teflon.

(*) L'elettrodo 5.1 e l'elettrodo 5.2 possono essere sostituiti dall'elettrodo combinato indicatore-riferimento.

6. Reattivi

6.1 Soluzione di riferimento di NaF

Sciogliere 221,1 mg di fluoruro di sodio anidro (NaF) (seccato a 105°C per due ore e raffreddato in essiccatore) e diluire a 1000 mL con acqua.
Diluire 1,0 mL - 5,0 mL - 10,0 mL e 20,0 mL della soluzione precedente a 1 litro, ottenendo soluzioni di lavoro con le seguenti concentrazioni in fluoruro:

0,1 mg/L - 0,5 mg/L - 1 mg/L - 2 mg/L

Le soluzioni devono essere conservate in bottiglie di teflon o di polietilene.
I valori della concentrazione di tali soluzioni sono stabiliti sulla base dell'intervallo di concentrazione dei fluoruri, poichè il metodo ha un intervallo di applicazione assai esteso (0,1-1000 mg/L). Ove si debba operare a concentrazioni maggiori di tale valore devono essere adeguati anche i valori delle soluzioni di riferimento.

6.2 Soluzioni tampone

Aggiungere a circa 500 mL di acqua distillata 57 mL di acido acetico glaciale, 58 g di cloruro di sodio e 0,30 g di citrato di sodio diidrato. Dopo aver agitato bene la soluzione per facilitare la dissoluzione dei composti aggiunti, questa viene raffreddata a temperatura ambiente e portata a pH 5,0-5,5 con circa 150 mL di una soluzione di NaOH 5 M.
Trasferire la soluzione in un pallone da 1 L e portare a volume.
Nel caso si operi su acque ad elevato contenuto salino (forza ionica ≥0,5 M), la concentrazione del cloruro di sodio nel tampone deve essere adeguatamente innalzata fino ad un valore pari a circa il doppio di quello del sale nelle acque in esame.
Nel caso di concentrazioni in fluoruro dell'ordine di grandezza di 0,1-1 mg/L è opportuno sostituire il citrato di sodio con l'acido trans-1,2-diamminocicloesan-N, N, N, N-tetracetico (CyDTA) che va aggiunto nella quantità di 2 g per 1 L di soluzione tampone. Ove infine vengano analizzate acque per le quali si prevede un rapporto F/ioni metallici particolarmente basso ($10^{-3} \div 10^{-4}$) le quantità di citrato di sodio indicate devono essere aumentate di un fattore 10÷50.

6.3 Soluzione di idrossido di sodio 5 M

Sciogliere in 1 L di acqua circa 200 g di idrossido di sodio (NaOH).

6.4 Acido acetico glaciale (d=1,05)

6.5 Acido trans-1,2-diammino-cicloesan-N, N, N, N-tetracetico (CyDTA)

7. Procedimento

Si possono impiegare tre metodi: il metodo della retta di taratura, il metodo dell'aggiunta ed il metodo delle aggiunte multiple.

7.1 Metodo della retta di taratura

Introdurre 10 mL di ciascuna delle soluzioni di fluoruro 0,1 mg/L - 0,5 mg/L - 1 mg/L - 2 mg/L (6.1) in un beaker insieme a 10 mL della soluzione tampone (6.2). Agitare la soluzione per 30 secondi e misurare la f.e.m. in quiete, dopo che il suo valore si è stabilizzato. Questo accorgimento dovrà applicarsi in tutte le altre misure di f.e.m. previste dal metodo. Quando il segnale si è stabilizzato (il tempo di attesa è tanto maggiore quanto più bassa è la concentrazione di fluoruro) il valore misurato viene riportato in ordinata in funzione del logaritmo della concentrazione, tracciando la retta che passa fra i quattro punti sperimentali.

Prelevare 10 mL del campione in esame e aggiungere 10 mL della soluzione tampone. Misurare la f.e.m. ed entrare nella retta di taratura con tale valore di ordinata determinando il valore dell'ascissa corrispondente, dal quale si ricava la concentrazione dello ione fluoruro nel campione in esame. La taratura e la misura devono essere effettuate alla medesima temperatura.

7.2 Metodo dell'aggiunta

Prelevare 10 mL del campione in esame, ai quali vengono aggiunti 10 mL della soluzione tampone; misurare la f.e.m. di questa soluzione.
Aggiungere 5 mL di una soluzione di fluoruro (6.1) la cui concentrazione sia circa da 10 a 100 volte maggiore di quella incognita ed altri 5 mL di soluzione tampone (6.2).
Misurare nuovamente la f.e.m. che risulta maggiore e sia ΔE la variazione. La concentrazione incognita si ricava dalla relazione:

$$\Delta E = 59{,}1 \log \frac{Q \cdot 0{,}33 + 0{,}17}{Q \cdot 0{,}50}$$

dove

$$Q = \frac{C_x}{C_n}$$

essendo C_x la concentrazione incognita e C_n la concentrazione della soluzione di fluoruro aggiunta, e 0,33 - 0,17 e 0,50 risultano da 10/30, 5/30 e 10/20 in relazione ai volumi impiegati per la prima determinazione e per l'aggiunta.

7.3 Metodo delle aggiunte multiple

Diluire 10 mL di campione con 10 mL della soluzione tampone (6.2). Una soluzione (6.1) con una concentrazione in ione fluoruro da 10 a 100 volte maggiore del campione in esame diluita 1:1 con la soluzione tampone (6.2), viene aggiunta, 1 mL per volta, alla soluzione precedente contenente il campione, fino ad un totale di 10 mL. Agitare la soluzione dopo ogni aggiunta e leggere il valore della f.e.m. Riportare in grafico, in funzione del volume aggiunto (v) di soluzione di fluoruro, la grandezza

$$(V+20) \cdot 10^{\frac{E}{59{,}1}}$$

dove E è la f.e.m. misurata (in mV) dopo ogni aggiunta e 20 è il volume iniziale in mL.
Si ottiene un retta che estrapolata sull'asse delle ascisse fornisce un volume V_s, di valore negativo sul grafico, che è correlato alla concentrazione C_x, da determinare dall'espressione

$$C_x = C_n \frac{V_s}{20}$$

dove 20 è il volume iniziale in mL della soluzione e C_n è la concentrazione della soluzione (6.1) impiegata per le aggiunte.

8. Qualità del dato

Dati pubblicati (APHA, 1998), riguardanti prove effettuate da 13 laboratori su soluzioni di acqua deionizzata contenenti 0,9 mg/L di fluoruro hanno permesso di calcolare una riproducibilità, espressa come coefficiente di variazione, [CV = (scarto tipo/valore medio)·100] pari al 3% ed un'accuratezza del 5%.
Va tenuto presente che la precisione e l'accuratezza di un metodo generalmente peggiorano all'aumentare della complessità della matrice.

BIBLIOGRAFIA

ASTM (1968): "*Annual Book of ASTM Standards*", Part 23, Water, Atmospheric Analysis (Philadelphia).

BAUMBER J. & GLINZ E. (1964): "Bestimmung von Fluoredronen", *Mitt. Lebensmittelunters Hyg.*, **55**, 250-264.

BUCK M. (1963): "Die Bestimmung kleiner Flurghalte in Pflanze", *Z Analyt. Chem,* **193,** 101-112.

FRANT M.S. & ROS H.W. (1968): "Use of a total ionic strength adjustment buffer for electrode determination of fluoride in water supplies", *Anal. Chem.*, **40**, 1169.

IRSA (1986 b): "Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **75**, 485-488.

LIBERTI A. & MASCINI M. (1969): " Anion determination with ion selective electrodes using Gran's plots. Application to fluoride", *Anal. Chem.*, **41**, 676.

RIX C.I., BOND A.M. & SMITH J.D. (1976): "Direct determination of fluoride in sea water with a fluoride selective ion electrode by a method of standard additions", *Anal. Chem.*, **48**, 1236.

SANCHIS J.M. (1934): "Determination of fluoride in natural waters", *Ind. Eng. Anal. Ed.,* **6**, 134.

TARAS M.J., CISCO M.D. & GARNELL M. (1950): "Interference in alizarin method of fluoride determination", *J. Amer. Water Works Ass.,* **42,** 583.

YAMAMURA S.S., WADE M.A. & SIKES J.H. (1962): "Direct spectrophotometric fluoride determination", *Anal. Chem.*, **34**, 1308-1312.

4110. Fosforo

Il fosforo, nelle acque naturali e di scarico, è presente quasi esclusivamente come fosfato, in particolare ortofosfato, fosfato condensato (piro-, meta-, polifosfato) e fosfato legato a composti organici. Queste specie possono trovarsi in forma solubile ed in forma particellata. Non è tuttavia da escludere la presenza di composti di fosforo a più basso numero di ossidazione. Ad ogni buon conto, al fine della determinazione del fosforo totale, qualunque sia la specie in cui si viene a trovare, il fosforo deve essere preliminarmente trasformato in ortofosfato. Tale trasformazione viene realizzata con un attacco ossidante per i composti organici e per quelli a numero di ossidazione inferiore a +5 e con l'idrolisi acida per i polifosfati.
Per il dosaggio dell'ortofosfato nelle acque viene descritto il metodo spettrofotometrico al blu di molibdeno, usando l'acido ascorbico come riducente.

METODO A1 - Dosaggio del fosforo come ortofosfato solubile

1. Principio del metodo

Gli ioni ortofosfato reagiscono con il molibdato di ammonio ed il potassio antimonil tartrato, in ambiente acido, formando un eteropoliacido che viene ridotto con acido ascorbico a blu di molibdeno, intensamente colorato, la cui assorbanza viene misurata alla lunghezza d'onda di 882 nm.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ad acque di scarico urbane ed industriali e ad acque naturali, acqua di mare compresa.
Può essere impiegato per un intervallo di concentrazione di fosforo compreso tra 0,001 e 0,3 mg/L, utilizzando celle di cammino ottico opportuno.

3. Interferenze e cause d'errore

Il rame (II) ed il ferro (III) non interferiscono se presenti in quantità inferiori rispettivamente a 10 e 50 mg/L.
L'arseniato interferisce in quanto fornisce la stessa reazione cromatica del fosfato; tale interferenza può essere significativa quando le concentrazioni dell'arseniato risultano nettamente superiori a quelle del fosfato.
Il cromo (VI) ed il nitrito danno interferenza negativa pari al 3%, se presenti in concentrazione superiore a 1 mg/L, ed al 10÷15%, se superiore a 10 mg/L.
Solfuri e composti del silicio non interferiscono se presenti in concentrazioni inferiori rispettivamente a 1,0 mg/L (S^{2-}) e 10,0 mg/L (SiO_2); per quanto concerne i composti del silicio, 20 mg/L di SiO_2 corrispondono a circa 0,005 mg/L di P.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".
Il campione deve essere filtrato, possibilmente subito dopo il prelievo, su filtro a membrana da 0,45 µm esente da fosfati.
Quando il fosforo deve essere determinato a livello di tracce (ad esempio in acque superficiali) è indispensabile effettuare la determinazione nel più breve tempo possibile. In caso contrario il campione deve essere conservato in bottiglie di polietilene e congelato.

5. Apparecchiature

5.1 Normale attrezzatura di laboratorio

Nella determinazione del fosforo è consigliabile utilizzare vetreria dedicata; essa va accuratamente lavata con acido cloridrico diluito, a caldo, risciacquata con acqua deionizzata e conservata, piena di acqua, fino al momento dell'uso. Non impiegare detergenti contenenti fosfato.

5.2 *Spettrofotometro* dotato di celle con cammino ottico di 1 cm (o superiore a seconda delle esigenze) adatto per misure intorno a 882 nm.

6. Reattivi

Tutti i reattivi debbono essere di grado analitico, e l'acqua usata deve essere bidistillata o deionizzata e distillata.

6.1 Soluzione di molibdato di ammonio

Sciogliere 9,5 g di eptamolibdato (VI) di esammonio tetraidrato [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}\cdot 4H_2O$] in 100 mL di acqua.
La soluzione, conservata in bottiglia di polietilene fuori del contatto con la luce, è stabile per molti mesi.

6.2 Soluzione di acido solforico 4,5 M

Versare cautamente e sotto raffreddamento 250 mL di H_2SO_4 concentrato (d=1,84) in un matraccio tarato da 1000 mL contenente circa 600 mL di acqua; lasciar raffreddare e quindi portare a volume. La soluzione viene conservata in bottiglia di vetro.

6.3 Soluzione di acido ascorbico

Sciogliere 7 g di acido ascorbico ($C_6H_8O_6$) in 100 mL di acqua. La soluzione deve essere conservata in bottiglia di polietilene ed in frigorifero quando non è utilizzata. In tal modo è stabile per una settimana.

6.4 Soluzione di potassio antimonil tartrato

Sciogliere 3,25 g di potassio antimonil tartrato emiidrato [$K(SbO)C_4H_4O_6\cdot 1/2H_2O$] in 100 mL di acqua, scaldando se necessario. La soluzione, conservata in bottiglia di vetro o di plastica, è stabile per molti mesi.

6.5 Reagente misto

Aggiungere 45 mL della soluzione di molibdato di ammonio (6.1) a 200 mL di acido solforico (6.2) e 5 mL di potassio antimonil tartrato (6.4). Agitare dopo ogni aggiunta.

6.6 Soluzione concentrata di fosforo (1 mL = 0,1 mg di P)

Sciogliere con acqua 0,4393 g di diidrogenofosfato di potassio anidro (KH_2PO_4) seccato a 105°C e diluire con acqua a 1000 mL in matraccio tarato. Conservare la soluzione in bottiglia scura, previa aggiunta di 1 mL di cloroformio. La soluzione è stabile per molti mesi.

6.7 Soluzione diluita di fosforo (1 mL = 0,001 mg di P)

Prelevare 10,0 mL della soluzione concentrata (6.6) e diluire a 1000 mL con acqua in matraccio tarato.

7. Procedimento

7.1 Taratura

In una serie di matracci tarati da 50 mL introdurre, ad esempio, 1 mL; 2,5 mL; 5 mL e 10 mL della soluzione diluita di fosforo (6.7) e portare a volume con acqua. In questo modo si ottengono soluzioni contenenti 0,02 mg/L; 0,05 mg/L; 0,100 mg/L e 0,200 mg/L di fosforo. Preparare inoltre un bianco con 50 mL di acqua deionizzata.
Aggiungere 1,5 mL di reagente misto (6.5), quindi 1,5 mL di acido ascorbico (6.3), agitando adeguatamente. Dopo 5 minuti ed entro due ore dall'aggiunta dei reattivi misurare, a temperatura non inferiore a 20°C, le assorbanze delle soluzioni alla lunghezza d'onda di 882 nm.

7.2 Dosaggio del campione

Prelevare 50 mL di campione e introdurli in un matraccio tarato da 50 mL. Aggiungere 1,5 mL di reagente misto (6.5), quindi 1,5 mL di acido ascorbico (6.3), agitando adeguatamente. Dopo 5 minuti ed entro due ore dall'aggiunta dei reattivi misurare, a temperatura non inferiore a 20°C, l'assorbanza del campione alla lunghezza d'onda di 882 nm.

7.3 Controllo del bianco dei reattivi

In genere il valore del bianco è dell'ordine di 0,010 unità di assorbanza, utilizzando celle con cammino ottico di 10 cm. Qualora si trovino valori di bianco troppo alti, si devono controllare la vetreria e i reattivi utilizzati, in particolare la soluzione di molibdato di ammonio (6.1).

8. Calcoli

La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le concentrazioni (mg/L) in ascissa e le assorbanze corrispondenti, corrette del bianco dei reattivi, in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile se la deviazione standard della retta stimata è inferiore al 10%. Calcolare quindi la concentrazione di ortofosfato nel campione utilizzando l'equazione ottenuta, tenendo conto dell'eventuale diluizione effettuata.

9. Qualità del dato

Su campioni di acque naturali aventi concentrazioni di fosforo comprese tra 30 e 120 μg/L

di fosforo, analizzati in quintuplicato da tre laboratori, si sono ottenuti valori del coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100, intorno al 5%.
Prove di recupero effettuate sugli stessi campioni hanno fornito rese superiori al 98%.

METODO A2 - Dosaggio del fosforo totale

1. Principio del metodo

Il metodo si basa su una preliminare trasformazione di tutti i composti del fosforo, organici ed inorganici, a ortofosfati mediante mineralizzazione acida con persolfato di potassio. Eventuali fosfati di metalli pesanti presenti in composti particolarmente resistenti all'attacco dei reagenti potrebbero non essere solubilizzati.
Gli ioni ortofosfato vengono quindi fatti reagire con il molibdato d'ammonio ed il potassio antimonil tartrato, in ambiente acido, in modo da formare un eteropoliacido che viene ridotto con acido ascorbico a blu di molibdeno, la cui assorbanza viene misurata alla lunghezza d'onda di 882 nm.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile a campioni di acque naturali, incluse le acque di mare, di scarichi industriali e urbani, nell'intervallo di concentrazione compreso tra 0,001 e 0,4 mg/L, utilizzando un'aliquota di 50 mL di acqua in esame e celle di opportuno cammino ottico.
Per concentrazioni più elevate occorre diluire opportunamente il campione.

3. Interferenze a cause di errore

Vedi Capitolo 3 metodo A1.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".
La determinazione del fosforo totale viene generalmente effettuata sul campione tal quale; qualora si sia interessati al fosforo totale disciolto il campione deve essere filtrato, possibilmente subito dopo il prelievo, su filtro a membrana da 0,45 µm esente da fosfati.
Quando il fosforo deve essere determinato a livello di tracce (ad esempio in acque superficiali) è indispensabile effettuare la determinazione nel più breve tempo possibile. In caso contrario il campione deve essere conservato in bottiglia di polietilene e congelato.

5. Apparecchiature

5.1 Normale attrezzatura di laboratorio

5.2 Spettrofotometro dotato di celle con cammino ottico di 1 cm (o superiore a seconda delle esigenze), adatto per misure intorno a 882 nm.

5.3 Beute Pyrex da 250 mL, con tappo a vite e guarnizione di politetrafluoroetilene (teflon).

5.4 Autoclave o stufa termostatata

Per ragioni di sicurezza si consiglia di effettuare l'ossidazione con la soluzione di persolfato di potassio (6.8) in autoclave. L'utilizzo della stufa termostatata può comportare rotture ed esplosioni delle beute con possibili rischi per l'incolumità degli operatori. In questo caso utilizzare beute di vetro Pyrex spesso o recipienti in teflon ed attendere un tempo sufficiente al raffreddamento delle soluzioni prima dell'apertura della stufa.

6. Reattivi

Tutti i reagenti debbono essere di grado analitico e l'acqua usata deve essere bidistillata o deionizzata e distillata.

6.1 Soluzione di molibdato di ammonio

Sciogliere 9,5 g di eptamolibdato (VI) di esammonio tetraidrato [$(NH_4)_6Mo_7O_{24}\cdot 4H_2O$] in 100 mL di acqua.
La soluzione, conservata in bottiglia di polietilene fuori del contatto con la luce, è stabile per molti mesi.

6.2 Soluzione di acido solforico 4,5 M

Versare cautamente e sotto raffreddamento 250 mL di H_2SO_4 concentrato (d=1,84) in un matraccio tarato da 1000 mL contenente circa 600 mL di acqua; lasciar raffreddare e quindi portare a volume. La soluzione viene conservata in bottiglia di vetro.

6.3 Soluzione di acido ascorbico

Sciogliere 7 g di acido ascorbico ($C_6H_8O_6$) in 100 mL di acqua. La soluzione deve essere conservata in bottiglie di polietilene ed in frigorifero quando non è utilizzata. In tal modo è stabile per una settimana.

6.4 Soluzione di tartrato di ossido di antimonio e potassio

Sciogliere 3,25 g di potassio antimonil tartrato emiidrato [$K(SbO)C_4H_4O_6\cdot 1/2H_2O$] in 100 mL di acqua, scaldando se necessario. La soluzione, conservata in bottiglia di vetro o di plastica, è stabile per molti mesi.

6.5 Reagente misto

Aggiungere 45 mL della soluzione di molibdato di ammonio (6.1) a 120 mL di acido solforico (6.2) e 5 mL di potassio antimonil tartrato (6.4). Agitare dopo ogni aggiunta.

6.6 Soluzione concentrata di fosforo (1 mL = 0,1 mg di P)

Sciogliere con acqua 0,4393 g di diidrogenofosfato di potassio anidro (KH_2PO_4) seccato a 105°C e diluire con acqua a 1000 mL in matraccio tarato. Conservare la soluzione in bottiglia scura, previa aggiunta di 1 mL di cloroformio. La soluzione è stabile per molti mesi.

6.7 Soluzione diluita di fosforo (1 mL = 0,001 mg di P)

Prelevare 10,0 mL della soluzione concentrata (6.6) e diluire a 1000 mL con acqua in matraccio tarato.

6.8 Soluzione di persolfato di dipotassio

Sciogliere 5 g di persolfato di potassio ($K_2S_2O_8$) in 100 mL di una soluzione contenente 15 mL di acido solforico 4,5 M (6.2). La soluzione, conservata in recipienti di polietilene, protetti dalla luce, è stabile per una settimana.

6.9 Soluzione di fenolftaleina

Sciogliere 0,5 g di fenolftaleina in una miscela di 50 mL di etanolo e 50 mL di acqua.

7. Procedimento

7.1 Taratura

In una serie di 5 beute con tappo a vite (5.3) introdurre, ad esempio, 5 mL; 10 mL; 15 mL e 20 mL della soluzione diluita di fosforo (6.7), che vengono portati a volume di 50 mL con acqua. In questo modo si ottengono soluzioni contenenti 0,1 mg/L; 0,2 mg/L; 0,3 mg/L e 0,4 mg/L. Preparare inoltre un bianco con 50 mL di acqua deionizzata. Sottoporre queste soluzioni allo stesso trattamento previsto per il campione (7.2), a partire dall'aggiunta del persolfato di potassio.

7.2 Dosaggio del campione

Omogeneizzare il campione e prelevare esattamente 50 mL. Per concentrazioni elevate prelevare un'aliquota di campione inferiore a 50 mL, diluire con acqua ad un volume opportuno e prelevare 50 mL. Introdurre nella beuta Pyrex con tappo a vite (5.3) i 50 mL. Aggiungere una goccia di fenolftaleina (6.9); se la soluzione si colora in rosso, aggiungere acido solforico 4,5 M (6.2), goccia a goccia, fino a decolorazione della soluzione. Quindi addizionare 2 mL di soluzione di persolfato di potassio (6.8) e trasferire le beute ben tappate in autoclave. Procedere all'ossidazione a 120°C per 30 minuti.
Lasciar raffreddare le soluzioni e quindi aggiungere 1,5 mL di reagente misto (6.5), quindi 1,5 mL di acido ascorbico (6.3), agitando adeguatamente. Dopo 5 minuti ed entro due ore dall'aggiunta dei reattivi misurare, a temperatura non inferiore a 20°C, l'assorbanza del campione alla lunghezza d'onda di 882 nm.

7.3 Controllo del bianco dei reattivi

Per la valutazione del bianco dei reattivi occorre procedere esattamente come descritto al paragrafo 7.2, dove al posto del campione si prelevano 50 mL di acqua.
In genere il valore del bianco è dell'ordine di 0,010 unità di assorbanza, utilizzando celle con cammino ottico di 10 cm. Qualora si trovino valori di bianco troppo alti, si devono controllare la vetreria e i reattivi utilizzati, in particolare la soluzione di molibdato di ammonio (6.1).

8. Calcoli

La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le concentrazioni (mg/L) in ascissa e le assorbanze corrispondenti, corrette del bianco dei reattivi, in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile se la deviazione standard della retta stimata è inferiore al 10%. Calcolare quindi la concentrazione di ortofosfato nel campione utilizzando l'equazione ottenuta, tenendo conto dell'eventuale diluizione effettuata.

9. Qualità del dato

Determinazioni effettuate (n=5) da un singolo laboratorio su campioni di acque naturali a concentrazioni comprese tra 20 e 100 µg/L hanno fornito valori del coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100, intorno al 5%.
Prove di recupero effettuate sugli stessi campioni hanno fornito rese intorno al 100%.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA).

ASTM (1988): "*Annual Book of ASTM Standard*", vol. 11.01,d 515-82A, (Philadelphia).

GRASSHOF K. (1976): "*Methods of Seawater Analysis*", Verlag Chemie (New York, Weinheim).

FAO (1975): "*Manual of Methods in Aquatic Research*", FIRI/T 137 (Roma).

IRSA (1982): "Metodi di analisi per acque di mare", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **59**, 330.1, 340.1

STRICKLAND J.D.H. & PARSONS T.R. (1972): "*A Practical Handbook of Sea Water Analysis*", Fisheries Research Board of Canada.

4120. Ossigeno disciolto

La determinazione dell'ossigeno disciolto viene eseguita mediante titolazione iodometrica secondo Winkler. Il punto finale può essere apprezzato mediante il viraggio dell'indicatore (metodi A1, A2, A3) o per via potenziometrica (metodo A4). Varie modifiche vengono suggerite per poter applicare il metodo di Winkler anche in presenza di sostanze riducenti (metodi A2 e A3).
In commercio sono disponibili apparecchiature per la determinazione amperometrica dell'ossigeno, in cui l'ossigeno disciolto in soluzione, passando attraverso una membrana, si riduce al catodo polarizzato di una cella elettrolitica o di una cella galvanica. Tali apparecchiature, per il cui utilizzo si rimanda ai manuali d'uso dello strumento, risultano idonee all'effettuazione di misure "in situ" in quei casi in cui non è possibile ricorrere al metodo di Winkler (es. controllo dell'ossigeno nel reattore a fanghi attivi di un impianto di depurazione).

METODO A1 - Titolazione iodometrica secondo Winkler

1. Principio del metodo

Il metodo si basa sull'ossidazione dell'idrossido di manganese (II) a stati di valenza superiore in soluzione alcalina da parte dell'ossigeno disciolto; per successiva acidificazione in presenza di ioduro, il manganese si riduce a Mn (II), liberando iodio in quantità equivalente all'ossigeno inizialmente presente nel campione. Lo iodio messo in libertà viene titolato con una soluzione a concentrazione nota di tiosolfato sodico, in presenza di salda d'amido.
Il metodo viene presentato nelle varianti secondo Alsterberg [impiegabile in presenza di nitriti (A1) e di sostanze organiche (A2)] e secondo Rideal-Stewart (A3), da adottarsi in presenza di ioni ferrosi.

2. Campo di applicazione

Il metodo, nelle sue varianti, è applicabile a campioni di acque di scarico, superficiali, sorgive e di mare per valori di concentrazione di ossigeno disciolto superiori a 0,5 mg/L.

3. Interferenze e cause di errore

Il metodo deve essere impiegato quando sono presenti più di 0,1 mg/L di nitriti e meno di 0,1 mg/L di ferro (II), ma non può essere applicato se sono presenti altre sostanze riducenti od ossidanti.
La determinazione può però essere eseguita anche in presenza di 100-200 mg/L di ferro (III) se prima dell'acidificazione del campione si aggiunge una soluzione di fluoruro di potassio e si esegue immediatamente dopo la titolazione.

4. Campionamento e conservazione del campione

Si raccomanda che il campionamento venga eseguito con bottiglie di vetro, munite di un tap-

po a due fori nei quali sono inseriti due tubi del diametro di circa 5 mm. Un tubo, che pesca sul fondo della bottiglia e sporge per circa 1 cm, serve ad assicurare un riempimento senza gorgogliamento di aria; il secondo, che penetra nella bottiglia per pochi centimetri e sporge dal tappo per almeno 10 cm serve ad espellere gradualmente l'aria durante il riempimento.
Al momento del prelievo, occorre determinare ed annotare la temperatura del campione.
È preferibile fissare sul posto l'ossigeno disciolto, mediante l'aggiunta di solfato di manganese e ioduro-sodio azide secondo la procedura indicata al I e II capoverso del Capitolo 7. Qualora ciò non fosse possibile conservare il campione al buio a +4°C ed effettuare l'analisi in tempi brevi (entro 8 ore).

5. Apparecchiature

5.1 *Bottiglie di vetro* da 300 mL con tappo a smeriglio o meglio a becco di flauto.

5.2 *Pipette da* 10 mL graduate a 0,1 mL e da 1 mL.

5.3 *Burette* da 50 mL graduate a 0,1 mL.

5.4 *Termometro* a 1/10 di grado nel campo utile di temperatura.

6. Reattivi

6.1 *Soluzione alcalina di ioduro-sodio azide (150 g/L di KI)*

Si possono usare indifferentemente composti del sodio o del potassio. Sciogliere 500 g di NaOH (o 700 g di KOH) e 135 g di NaI (o 150 g di KI) in acqua distillata, e diluire a circa 900 mL. Aggiungere lentamente alla soluzione fredda, sotto continua agitazione, 10 g di sodio azide, NaN_3, sciolti in 40 mL di acqua distillata, e portare ad 1 L con acqua.
Diluendo 1 mL di reattivo a 50 mL e acidificando, per aggiunta di salda d'amido non si deve osservare alcuna colorazione. Conservare in bottiglia scura con tappo di gomma.

6.2 *Soluzione di solfato manganoso*

Sciogliere 364 g di $MnSO_4 \cdot H_2O$ in acqua distillata; filtrare se necessario e diluire ad 1 L. Aggiungendo a questa soluzione una soluzione acida di KI si devono osservare solo tracce di iodio.

6.3 *Soluzione di fluoruro di potassio*

Sciogliere 40 g di $KF \cdot 2H_2O$ in acqua distillata e diluire a 1000 mL.

6.4 *Soluzione di riferimento di tiosolfato sodico (0,1 N)*

Si consiglia l'utilizzo di soluzioni 0,1 N disponibili in commercio.
In alternativa, sciogliere, in un matraccio tarato da 1 L, 25 g di tiosolfato sodico ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) in circa 800 mL di acqua deionizzata. Aggiungere come stabilizzante 1 g di carbonato sodico oppure 4 g di tetraborato sodico. Portare a 1 L con acqua. Il controllo del titolo della soluzione di tiosolfato viene eseguito con soluzioni 0,1 N di KIO_3 o $KH(IO_3)_2$ disponibili in commercio o preparate sciogliendo 3,5670 g di KIO_3 o 3,2500 g di $KH(IO_3)_2$ in acqua e diluendo ad 1 L.
In una beuta con tappo a smeriglio sciogliere 2 g di KI esente da iodio in circa 100 mL di acqua. Aggiungere 7 mL di HCl concentrato e trasferire nella beuta 25-30 mL di soluzione di riferimento di iodato o di idrogenoiodato di potassio. Titolare immediatamente con la soluzione di tiosolfato usando salda d'amido come indicatore, secondo le modalità indicate al

Capitolo 7. Noti il volume e la normalità della soluzione standard e il volume di tiosolfato consumato nella titolazione ricavare la normalità della soluzione di tiosolfato.

6.5 Soluzione di riferimento di tiosolfato sodico (0,0125 N)

Diluire 125 mL della soluzione (6.4) a 1000 mL con acqua. 1 mL $Na_2S_2O_3$ 0,0125 N corrisponde a 0,1 mg di ossigeno.

6.6 Salda d'amido

Porre in un mortaio 5-6 g di amido e alcuni mL di acqua fredda. Macinare la pasta risultante, che viene poi versata in 1000 mL di acqua bollente. Far bollire per pochi minuti e lasciar depositare una notte. Utilizzare il liquido sovrastante. La soluzione può essere stabilizzata aggiungendo, per ogni litro, circa 1 g di acido salicilico.

6.7 Acido solforico concentrato (d=1,84)

1 mL di questo acido è equivalente a circa 3 mL del reattivo ioduro alcalino-sodio azide.

7. Procedimento

Aggiungere al campione contenuto nella bottiglia con tappo a smeriglio, 2 mL di soluzione di solfato di manganese e 2 mL di soluzione alcalina di ioduro-sodio azide, avendo cura di introdurre le soluzioni sotto la superficie del liquido.
Chiudere la bottiglia eliminando le bolle d'aria e agitare capovolgendo molte volte la bottiglia; ripetere l'agitazione una seconda volta dopo che il precipitato si è depositato lasciando il liquido sovrastante limpido.
Quando il precipitato si è nuovamente depositato lasciando almeno 100 mL di liquido limpido, aprire la bottiglia e aggiungere 2 mL di H_2SO_4 concentrato, avendo cura di farlo fluire lungo il collo della bottiglia.
Se il campione contiene ferro (III), aggiungere, prima di acidificare, 1 mL di soluzione di KF.
Tappare nuovamente la bottiglia ed effettuare il mescolamento capovolgendo varie volte la bottiglia finchè lo iodio non è uniformemente distribuito; far decantare la soluzione e titolare subito 100 mL con la soluzione di tiosolfato (6.5), fino a un colore giallo paglierino. Aggiungere la salda d'amido e continuare a titolare fino a scomparsa del colore azzurro.

8. Calcoli

La concentrazione dell'ossigeno disciolto può essere espressa in mg/L di ossigeno, in mL di ossigeno 0°C e 760 mm Hg per litro di soluzione, o anche in percentuale di saturazione.

8.1 Ossigeno disciolto

$$\text{OD (mg/L)} = \frac{a \times N \times f \times 8}{V} \times 1000$$

dove:
a = volume (mL) di tiosolfato consumato per la titolazione;
N = normalità della soluzione di tiosolfato;
f = volume bottiglia/(volume bottiglia-volume reattivi). Fattore di correzione che tiene conto del volume spostato per l'introduzione dei reagenti di fissaggio;
8 = peso equivalente dell'ossigeno;
V = volume (mL) di campione.

8.2 Ossigeno disciolto (mL/L a 0°C e 760 mm Hg)

$$OD\ (mg/L) = \frac{a \times N \times f \times 8}{V} \times 1000 \times 0{,}7$$

dove 0,7 rappresenta il fattore di conversione da mg a mL di ossigeno.

8.3 Percentuale di saturazione

Corrisponde al rapporto percentuale tra la concentrazione dell'ossigeno disciolto determinata e la corrispondente concentrazione di saturazione alla temperatura registrata al momento del prelievo, ambedue espresse in mg/L di O_2.
La concentrazione di saturazione può essere ricavata dalla Tab. 1 nella quale la solubilità dell'ossigeno è riportata in funzione della temperatura e della clorinità* della soluzione, alla pressione di 760 mm Hg.
Per pressioni diverse da detto valore, la concentrazione di saturazione si ricava dalla seguente formula di correzione:

$$S_p = S_{760} \frac{P - p}{760 - p}$$

in cui:
S_p = concentrazione di saturazione (mg/L O_2) alla pressione P;
S_{760} = concentrazione di saturazione (mg/L O_2) a 760 mm Hg ricavata dalla Tab. 1;
P = pressione ambiente (mm Hg);
p = tensione di vapore dell'acqua alla temperatura del campione (mm Hg).

Per altitudini inferiori a 1000 m s.l.m. e temperature inferiori ai 20°C, il termine relativo alla tensione di vapore dell'acqua può essere trascurato.

Tabella 1: Solubilità dell'ossigeno in acqua esposta ad aria satura di vapor d'acqua a pressione atmosferica (101,3 kPa)

	OD (mg/L)					
Temperatura (°C)	Clorinità: 0	5,0	10,0	15,0	20,0	25,0
0,0	14,6	13,7	12,9	12,1	11,3	10,7
1,0	14,2	13,4	12.5	11,8	11,1	10,4
2,0	13,8	13,0	12,2	11,5	10,8	10,1
3,0	13,5	12,7	11,9	11,2	10,5	9,9
4,0	13,1	12,3	11,6	10,9	10,3	9,7
5,0	12,8	12,0	11,3	10,7	10,0	9,4
6,0	12,5	11,7	11,1	10,4	9,8	9,2
7,0	12,1	11,4	10,8	10,2	9,6	9,0
8,0	11,8	11,2	10,5	9,9	9,4	8,8
9,0	11,6	10,9	10,3	9,7	9,2	8,6
10,0	11,3	10,7	10,1	9,5	9,0	8,4
11,0	11,0	10,4	9,8	9,3	8,8	8,3
12,0	10,8	10,3	9,6	9,1	8,6	8,1
13,0	10,5	10,0	9,4	9,0	8,4	7,9
14,0	10,3	9,7	9,2	8,7	8,2	7,8
15,0	10,0	9,5	9,0	8,5	8,1	7,6
16,0	9,9	9,3	8,8	8,4	7,9	7,5
17,0	9,7	9,1	8,7	8,2	7,8	7,4
18,0	9,5	9,0	8,5	8,0	7,6	7,2

segue

* La clorinità è legata alla salinità dalla seguente relazione: Salinità = 1,80655 x clorinità (1)

segue *Tabella 1*

Temperatura (°C)	Clorinità: 0	OD (mg/L) 5,0	10,0	15,0	20,0	25,0
19,0	9,3	8,8	8,3	7,9	7,4	7,1
20,0	9,1	8,6	8,2	7,8	7,3	7,0
21,0	8,9	8,5	8,0	7,6	7,2	6,8
22,0	8,7	8,3	7,9	7,5	7,1	6,7
23,0	8,6	8,1	7,7	7,3	7,0	6,6
24,0	8,4	8,0	7,6	7,2	6,8	6,5
25,0	8,3	7,8	7,5	7,1	6,7	6,4
26,0	8,1	7,7	7,3	7,0	6,6	6,3
27,0	8,0	7,6	7,2	6,8	6,5	6,2
28,0	7,8	7,4	7,1	6,7	6,4	6,1
29,0	7,7	7,3	7,0	6,6	6,3	6,0
30,0	7,6	7,2	6,8	6,5	6,2	5,9

I dati riportati in Tab. 1 sono stati ricavati dalla seguente equazione (2):

$$\ln DO^* = -139{,}34411 + \left(1{,}575701 \times \frac{10^5}{T}\right) - \left(6{,}642308 \times \frac{10^7}{T^2}\right) + \left(1{,}243800 \times \frac{10^{10}}{T^3}\right) - \left(8{,}621949 \times \frac{10^{11}}{T^4}\right)$$
$$- Chl\left[\left(3{,}1929 \times 10^{-2}\right) - \left(1{,}9428 \times \frac{10^1}{T}\right) + \left(3{,}8673 \times \frac{10^3}{T^2}\right)\right]$$

in cui:
DO^* = concentrazione di ossigeno all'equilibrio a 101,325 kPa (760 mm Hg);
T = temperatura (°K) = °C + 273,150 (3);
Chl = clorinità (si ricava dalla salinità mediante l'equazione (1) riportata nella nota a pagina precedente).

Un modo pratico e veloce per ricavare la concentrazione di ossigeno all'equilibrio consiste nell'utilizzare un foglio "Excel", come descritto nell'esempio riportato in Tab. 2.

Tabella 2: Foglio "Excel" per il calcolo rapido della concentrazione di ossigeno all'equilibrio

Temp (°C)	Temp (°K)	OD (mg/L)	Chl	ln OD*	OD*	% OD	100-OD
20	293.15	8.5	0	2.20744	9.09243	93.5	6.5
18	291.15	7.5	0	2.24781	9.467	79.2	20.8

- inserire nella prima colonna del foglioExcel la temperatura sperimentale (°C);
- nella seconda colonna viene indicata automaticamente la temperatura in °K [ricavata dall'equazione (3)];
- inserire nella terza colonna il valore di ossigeno disciolto (OD);
- nella quarta colonna inserire la clorinità sperimentale [o ricavata dall'equazione (1)];
- nella quinta colonna viene indicata automaticamente il logaritmo naturale della concentrazione di OD all'equilibrio [ricavata dall'equazione (2)];
- nella sesta colonna viene indicata automaticamente la concentrazione di O_2 all'equilibrio [ricavata dall'equazione (2)];
- nella settima colonna viene indicata automaticamente la percentuale di saturazione rispetto all'equilibrio (OD/OD*);
- nella ottava colonna viene indicato automaticamente il dato (da considerare in valore assoluto) richiesto dal D.Lgs. 152/99 [100-OD(%)].

9. Qualità del dato

Prove effettuate (n=5) da tre laboratori su acqua deionizzata contenente 6 mg/L di ossigeno hanno fornito valori del coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100, inferiori al 5%. Su campioni di acque di scarico si sono ottenuti coefficienti di variazione inferiori al 10%.

METODO A2

Se sono presenti sostanze organiche, il metodo A1 può essere modificato impiegando una soluzione alcalina di ioduro-sodio azide più concentrata, preparata nel seguente modo: sciogliere 400 g di idrossido di sodio in 500 mL di acqua deionizzata; aggiungere 100 g di ioduro di sodio.
Sciogliere 10 g di sodio azide in 40 mL di acqua. Aggiungere lentamente questa soluzione, sotto agitazione, alla soluzione di ioduro alcalino, portando il volume totale a 1000 mL con acqua.
Procedere poi secondo le modalità descritte nel metodo A1.

METODO A3

Questa variante viene utilizzata solo se il campione contiene ferro (II). Per eliminare l'interferenza dovuta ad elevate concentrazioni di ferro (III) (100-200 mg/L), aggiungere 1 mL di soluzione di KF e titolare immediatamente dopo l'acidificazione.
Per i Capitoli da 1 a 5 vedi Metodo A1.

6. Reattivi

6.1 Soluzioni di solfato di manganese, fluoruro di potassio, acido solforico concentrato, tiosolfato sodico 0,0125 N, salda d'amido come descritte rispettivamente in 6.2, 6.3, 6.7, 6.5 e 6.6 del metodo A1.

6.2 Soluzioni alcaline di ioduro

Composti del sodio e del potassio possono essere usati indifferentemente. Sciogliere 500 g di idrossido di sodio (o 700 g di idrossido di potassio) e 135 g di ioduro di sodio (o 150 di ioduro dì potassio) in acqua distillata diluendo ad 1 L.
La soluzione, diluita ed acidificata, non deve colorarsi per aggiunta di salda d'amido.

6.3 Soluzione di permanganato di potassio (6,3 g/L)

Sciogliere 6,3 g di permanganato di potassio ($KMnO_4$) in acqua e diluire ad 1 L.

6.4 Soluzione di ossalato di potassio

Sciogliere 2 g di ossalato di potassio ($K_2C_2O_4 \cdot H_2O$) in 100 mL di acqua.

7. Procedimento

Acidificare il campione con 0,70 mL di H_2SO_4 e aggiungere quindi 1,0 mL di soluzione di $KMnO_4$ (6.3). Se è presente ferro (III) in notevole concentrazione, aggiungere anche 1,0 mL di soluzione di KF. Tappare la bottiglia e mescolare la soluzione capovolgendo molte volte la bot-

tiglia. La soluzione deve mantenere un colore viola per 5 minuti; se si decolora prima di questo periodo, aggiungere un volume maggiore di soluzione di permanganato evitandone però un notevole eccesso. Se si debbono impiegare più di 5 mL di soluzione di permanganato, è opportuno usare una soluzione più concentrata per evitare una eccessiva diluizione del campione. Dopo 5 minuti la soluzione va decolorata aggiungendo 0,5-1,0 mL di soluzione di ossalato (6.4). Mescolare la soluzione e lasciare riposare al buio. Si hanno risultati in difetto se vi è un eccesso di ossalato, per cui è importante che tale eccesso non superi 0,5 mL. La decolorazione deve aver luogo in 2-10 minuti.
Dopo decolorazione aggiungere 2 mL di soluzione di solfato di manganese e 3 mL di soluzione alcalina di ioduro. Chiudere la bottiglia e agitare capovolgendola più volte. Dopo che il precipitato si è separato lasciando un liquido sovrastante limpido, agitare ancora per 20 secondi. Quando il precipitato si è nuovamente depositato lasciando almeno 100 mL di soluzione limpida, acidificare con 2 mL di H_2SO_4 concentrato e titolare con $Na_2S_2O_3$ e salda d'amido come descritto nel metodo A1.

8. Calcoli

Procedere come descritto nel Metodo A1, Capitolo 8.

9. Qualità del dato

Vedi Metodo A1, Capitolo 9.

METODO A4 - Determinazione automatica potenziometrica

1. Principio del metodo

In questo metodo si utilizza la titolazione iodometrica precedentemente descritta, ma il punto finale della titolazione, determinato dalla scomparsa della specie ossidata I_2, viene rilevato direttamente per via potenziometrica. L'uso della titolazione automatica potenziometrica consente un'elevata precisione delle misure e soprattutto conferisce oggettività alla determinazione del punto finale della reazione. Tali caratteristiche permettono di impiegare questo metodo, ad esempio, per quantificare con sufficiente precisione i consumi di ossigeno conseguenti alla respirazione di comunità planctoniche, al fine di una descrizione delle attività metaboliche in relazione alle caratteristiche ambientali.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile a campioni di acque naturali.

3. Interferenze e cause d'errore

L'aggiunta della sodio-azide, prevista nel metodo di Winkler per eliminare l'interferenza dei nitriti, è ritenuta essere causa di un errore nell'accuratezza pari all'1%. È possibile evitare questa aggiunta quando la concentrazione di NO_2^- è inferiore a 15 $\mu mol \cdot L^{-1}$.
Le cause d'errore più frequenti sono legate alla fase di campionamento che va effettuato con molta cura per non alterare l'equilibrio iniziale nella concentrazione di ossigeno disciolto. Dopo aver aggiunto i reattivi per il fissaggio dell'ossigeno disciolto ed aver tappato la bottiglia si raccomanda di agitarla dai 30 secondi al minuto. Dopo circa 1/2 ora ripetere l'agitazione. La reazione di ossidazione del manganese bivalente da parte dell'ossigeno disciolto, av-

venendo tra fasi eterogenee, (l'ossigeno è in soluzione ed il manganese in forma di idrossido precipitato) È infatti lenta. Valori di ossigeno disciolto sottostimati sono talvolta il risultato di un'eccessiva fretta in questa fase della procedura.
L'operazione di dissoluzione del precipitato per acidificazione, successiva alla fissazione dell'ossigeno, deve essere effettuata solo immediatamente prima della titolazione. Questa accortezza previene la volatilizzazione dello iodio nel campione acidificato che causerebbe una sottostima della concentrazione dell'ossigeno.
Per un migliore funzionamento del titolatore automatico è necessario degasare la soluzione di tiosolfato, gorgogliando elio per almeno 10 minuti. Questa accortezza evita la formazione col tempo di bolle d'aria nel sistema automatico di aspirazione della soluzione titolante. La presenza di bolle d'aria causerebbe infatti una sovrastima del volume utilizzato di tiosolfato, determinato automaticamente, e quindi della concentrazione di ossigeno disciolto del campione.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campione da analizzare, prelevato tramite le comuni bottiglie usate nella pratica oceanografica e limnologica, deve essere raccolto immediatamente dopo il prelievo al fine di ridurre gli scambi di ossigeno del campione con quello atmosferico. Per il trasferimento del campione nelle bottiglie di raccolta, è utilizzato un tubo di silicone applicato al rubinetto della bottiglia di prelievo. L'estremità libera del tubo è mantenuta sollevata fino all'apertura del rubinetto. Per il campionamento di acque superficiali si rimanda alle modalità descritte al Capitolo 4 del metodo A1.
Dopo aver proceduto a lavaggi ripetuti di tappo e bottiglia, porre l'estremità del tubo sul fondo della bottiglia di raccolta, riempire completamente la bottiglia evitando il gorgogliamento e l'adesione sulle pareti di bolle d'aria durante l'operazione. Un volta riempita la bottiglia, lasciar defluire abbondantemente l'acqua fuori dalla stessa e togliere il tubo prima di interrompere il flusso. È necessario fissare il campione immediatamente dopo il prelievo seguendo il procedimento descritto nel Paragrafo 7.2. I campioni così fissati devono essere comunque analizzati il prima possibile.
Le bottiglie contenenti il campione fissato sono conservate in posizione verticale, immerse nell'acqua fino al collo, al buio e a temperatura prossima a quella del campione al momento del prelievo. La conservazione delle bottiglie all'aria, ad una temperatura inferiore a quella del campione, può determinare la formazione di bolle che influiscono negativamente sull'accuratezza della misura.

5. Apparecchiature

5.1 Bottiglie di vetro tipo BOD, complete di tappo di vetro smerigliato a becco di flauto o a punta arrotondata.

Il volume delle bottiglie è scelto in funzione delle singole esigenze operative a partire da 30 mL. Il volume preciso delle bottiglie va determinato per pesata dopo averle riempite di acqua a temperatura ambiente, tappate e accuratamente asciugate. È necessario marcare quindi il tappo e la bottiglia con lo stesso numero al fine di utilizzarli sempre accoppiati.

5.2 Tubo di silicone

5.3 Termometro

5.4 Pipette automatiche o "dispenser" da 1 e 20 mL

5.5 Titolatore automatico completo di elettrodo combinato al platino, buretta a pistone (5 mL) e agitatore

6. Reattivi

6.1 Soluzione di cloruro di manganese (3 M)

Sciogliere 150 g di $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ in 250 mL di acqua distillata. Raggiunto il completo scioglimento, filtrare e conservare in una bottiglia di plastica o vetro scuri.

6.2 Soluzione alcalina di ioduro di sodio (4 M) e sodio idrossido (NaOH 8 M)

Sciogliere 150 g di NaI in circa 200 mL di acqua distillata a piccole dosi. Se il colore della soluzione appare giallo-marrone, ripetere la preparazione con reagenti nuovi. Dopo aver raffreddato la soluzione ottenuta, aggiungere 80 g di NaOH. Agitare fino alla scomparsa del precipitato e portare la soluzione ad un volume finale di 250 mL a temperatura ambiente. Conservare la soluzione in una bottiglia di plastica scura.

6.3 Soluzione diluita di acido solforico (28% v/v)

Questa soluzione va preparata con cautela. Porre un pallone graduato da 100 mL in acqua fredda. Introdurre una parte di acqua distillata nel pallone e poi gradualmente 28 mL di H_2SO_4 (d=1,84) con una pipetta Pasteur. Portare a volume a temperatura ambiente.

6.4 Soluzione di riferimento di tiosolfato sodico (0,01 N)

Pesare 2,5 g di tiosolfato sodico e portare il volume ad 1 L con acqua distillata. In alternativa è possibile utilizzare una soluzione di $Na_2S_2O_3$ a concentrazione nota disponibile in commercio. La soluzione può essere conservata a temperatura ambiente e in una bottiglia scura per qualche giorno.

6.5 Soluzione di iodato di potassio (0,01 N)

Essiccare il reagente (KIO_3) in un essiccatore sotto vuoto o a 110°C, quindi pesarne con esattezza 0,3467 g. Scioglierlo in 200-300 mL di acqua distillata, scaldando se necessario, e portare il volume ad 1 L con acqua distillata. In alternativa, è possibile preparare la soluzione a partire da fiale a concentrazione standard (0,1 N).

7. Procedimento

7.1 Controllo della soluzione di tiosolfato

Poiché piccole variazioni del titolo della soluzione di tiosolfato sodico (6.4) possono influire sul calcolo della concentrazione finale di ossigeno, è necessario procedere al suo controllo giornalmente.
Versare nel recipiente di titolazione 30 mL di acqua distillata, aggiungere 0,5 mL di acido solforico (6.3) e 0,250 mL della soluzione alcalina di ioduro di sodio (6.2). Agitare molto bene. Quindi aggiungere 0,250 mL di soluzione di cloruro di manganese (6.1) e agitare nuovamente. Aggiungere infine 3 mL esatti di iodato di potassio KIO_3 (6.5). Mantenere in agitazione per 2 minuti per consentire lo sviluppo quantitativo dello I_2 e titolare con tiosolfato sodico (6.4) come descritto nel Paragrafo 7.3. Noti il volume e la normalità della soluzione di iodato di potassio e il volume di tiosolfato consumato nella titolazione ricavare la normalità della soluzione di tiosolfato.
Si consiglia di ripetere il procedimento su 3-5 preparazioni e di utilizzare la concentrazione media risultante.

7.2 Analisi del campione

Trasferire il campione nella bottiglia seguendo scrupolosamente le indicazioni descritte nel Capitolo 4. Nel caso si usino bottiglie da 30 mL, aggiungere immediatamente ed in successione 0,25 mL di cloruro di manganese e 0,25 mL della soluzione alcalina di ioduro di sodio ponendo i puntali delle pipette automatiche o "dispenser" sotto la superficie del campione nella bottiglia. Nel caso si usino bottiglie a volume maggiore aumentare proporzionalmente le quantità dei due reattivi. Chiudere con il tappo avendo cura di non intrappolare bolle all'interno del campione. Agitare vigorosamente la bottiglia. Non appena il precipitato è sedimentato per i due terzi del volume della bottiglia (circa 1/2 ora), agitare nuovamente. Registrare quindi la temperatura originale del campione nella bottiglia di prelievo.
Attendere 6-8 ore per la completa sedimentazione del precipitato. Solo immediatamente prima della titolazione rimuovere il tappo senza disturbare il precipitato e aggiungere alla superficie del campione in bottiglia 0,5 mL della soluzione di acido solforico (aumentare in proporzione nel caso di impiego di bottiglie con volumi maggiori). Chiudere la bottiglia, evitando se possibile di lasciare bolle d'aria, e agitare energicamente fino alla completa dissoluzione del precipitato. Immediatamente dopo prelevare senza gorgogliare 20 mL di campione, versarlo nel recipiente di titolazione e avviare la titolazione.
È possibile titolare anche tutto il contenuto della bottiglia. In questo caso, dopo aver versato quantitativamente il campione nel recipiente di titolazione, si deve lavare accuratamente il tappo e bottiglia con poca acqua distillata recuperando l'acqua di lavaggio direttamente nel campione da titolare.

7.3 Titolazione

La titolazione automatica è effettuata sotto agitazione costante attraverso piccole aggiunte della soluzione di riferimento di sodio tiosolfato. Alcuni titolatori sono dotati della funzione di *titolazione dinamica* nella quale il volume di titolante aggiunto si riduce o incrementa automaticamente, durante la titolazione, in funzione della pendenza della curva del potenziale misurato. Se presente, questa modalità di titolazione è quella da preferire. Altri titolatori possono lavorare solo in modalità di *titolazione monotonica*, il che significa che la titolazione avviene per aggiunte successive di un volume fisso di titolante. In tali casi bisogna avere l'accortezza di impostare un volume sufficientemente piccolo per ciascuna aggiunta (<100 µL) altrimenti si corre il rischio di definire in modo impreciso il punto finale della reazione. Alcuni titolatori dispongono di una funzione di predosaggio attraverso cui è possibile impostare il volume di titolante della prima aggiunta (ad esempio 1 mL) per ridurre il tempo di attesa. Il volume di tiosolfato al punto di equivalenza è quindi registrato ed utilizzato successivamente per il calcolo.

8. Calcoli

Calcolare la concentrazione di ossigeno disciolto (OD) nel campione nel modo seguente:

$$\text{OD (mg/L)} = \frac{a \times N \times f \times 8}{V} \times 1000$$

dove:
a = volume (mL) di tiosolfato consumato per la titolazione;
N = normalità della soluzione di tiosolfato;
f = volume bottiglia/(volume bottiglia - volume reattivi). Fattore di correzione che tiene conto del volume spostato per l'introduzione dei reagenti di fissaggio (per 30 mL di campione 0,5 mL di reattivi in totale);
8 = peso equivalente dell'ossigeno;
V = volume (mL) di campione.

9. Qualità del dato

Nelle condizioni esposte il coefficiente di variazione della misura di ossigeno disciolto, effettuata da un singolo laboratorio, in un campione naturale è risultato pari a 0,35% (valore medio 8,128 mg/L, n=5).

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*",' XX Ed., (Washington, APHA), 4-129/4-133.

GRANELI W. & GRANELI E. (1991): "Automatic potentiometric determination of dissolved oxygen", *Marine Biology*, **108**, 341-348.

McKEOWN J.J., BROWN L.C. & GOVE G.W. (1967): "Comparative studies of dissolved oxygen analysis methods", *J. Water Pollut. Control Fed.*, **39**, 1323.

MONTGOMERY H.A.E., THOM N.S. & COCKBURN A. (1964): "Determination of dissolved oxygen by the Wilkler method and the solubility of oxygen in water and sea water", *J. Appl. Chem.*, **14,** 280**.**

NATIONAL INSTITUTE of OCEANOGRAPHY of GREAT BRITAIN and UNESCO (1973): "*International oceanographic tables*", Volume 2 (UNESCO, Paris).

4130. Silice

1. Principio del metodo

La silice presente nelle acque è determinata per via spettrofotometrica. Il metodo si basa sulla reazione dello ione silicico con molibdato di ammonio, con formazione di un complesso giallo, successivamente ridotto a blu di molibdeno, la cui assorbanza viene misurata alla lunghezza d'onda di 650 nm.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ad acque naturali e di scarico nell'intervallo di concentrazioni 0,5-2,5 mg/L, utilizzando celle aventi cammino ottico di 1 cm. L'utilizzo di celle con cammino ottico di 5 cm consente di apprezzare concentrazioni fino a 0,1 mg/L.

3. Interferenze e cause di errore

Lo ione fosfato, che interferisce con il reattivo molibdico, poiché dà la stessa colorazione, viene previamente fatto reagire con acido ossalico; quest'ultimo elimina l'interferenza scindendo il complesso fosfomolibdico. L'aggiunta di acido ossalico riduce anche l'interferenza dei composti tanninici.
Dell'interferenza eventuale del colore e/o della torbidità del campione sulla determinazione finale, si può tener conto con una compensazione spettrofotometrica.
Il ferro in concentrazioni superiori a 0,5 mg/L può interferire abbassando l'intensità del colore. In questo caso può essere utile eseguire la determinazione di un'aliquota inferiore di campione diluita a 50 mL.
Non tutta la silice presente nel campione d'acqua in forma disciolta o colloidale reagisce con il molibdato di ammonio. La frazione cosiddetta non reattiva al molibdato d'ammonio può essere dosata con lo stesso metodo dopo digestione con carbonato di sodio.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione debbono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".

5. Apparecchiature

5.1 *Spettrofotometro* per misure tra 600 e 700 nm, corredato di celle aventi cammino ottico di 1 cm o superiori.

5.2 *Normale attrezzatura di laboratorio*

Tutto il materiale utilizzato deve essere di polietilene, lavato con HCl diluito 1+1 e quindi risciacquato opportunamente con acqua. Si consiglia l'utilizzo di materiale dedicato.

6. Reattivi

I reattivi debbono essere a basso contenuto di silice.

6.1 Acido cloridrico diluito 1+1

6.2 Reattivo molibdico

Sciogliere 10 g di $(NH_4)_6Mo_7O_{24}\cdot 4H_2O$ in acqua, agitando e riscaldando debolmente, e diluire a 100 mL. Filtrare se necessario. Portare a pH 8-9 con ammoniaca concentrata e trasferire in bottiglia di polietilene, per evitare che il reattivo si alteri troppo rapidamente durante la conservazione. In questa maniera il reattivo mantiene la sua stabilità per almeno 3 mesi.

6.3 Acido ossalico

Sciogliere 10 g di $H_2C_2O_4\cdot 2H_2O$ in acqua deionizzata e diluire a 100 mL.

6.4 Soluzione riducente

Sciogliere 0,5 g di acido 1-ammino-2-naftol-4-solfonico e 1 g di solfito di sodio anidro (Na_2SO_3) in 50 mL di acqua, scaldare debolmente se necessario; a questa soluzione aggiungere 27,4 g di metabisolfito di sodio ($Na_2S_2O_5$) previamente disciolti in 150 mL di acqua.
Filtrare se necessario e conservare in bottiglia di polietilene. La soluzione va sostituita non appena imbrunisce.

6.5 Soluzione concentrata di silice (1000 mg/L)

Sciogliere 4,732 g di metasilicato di sodio ($Na_2SiO_3\cdot 9H_2O$, reagente puro) in acqua deionizzata; diluire a 1 litro.

6.6 Soluzione diluita di silice (10 mg/L)

Diluire 10 mL della soluzione (6.5) a 1 L con acqua deionizzata; 1 mL di questa soluzione contiene 10 µg di SiO_2. Conservare in bottiglia di polietilene.

7. Procedimento

Filtrare circa 50 mL di campione per eliminare la silice insolubile. A 50 mL di filtrato aggiungere nell'ordine: 1 mL di HCl diluito 1+1 (il pH deve risultare inferiore a 2) e 2 mL di reattivo molibdico. Agitare e, dopo 5 minuti di riposo, aggiungere nell'ordine 1,5 mL di acido ossalico e 2 mL di soluzione riducente. Agitare energicamente un'altra volta e, allo scadere dei 15 minuti dall'aggiunta della soluzione riducente, leggere l'assorbanza a 650 nm in celle da 1 cm di cammino ottico contro un bianco di acqua trattata alla stessa maniera del campione.

7.1 Taratura

Preparare 5 soluzioni di riferimento nel campo di applicabilità del metodo, diluendo opportunamente la soluzione diluita di silice (6.6) con acqua deionizzata. Seguire lo stesso procedimento analitico indicato al Capitolo 7.
Costruire la curva di taratura riportando in ascisse le quantità di silice (µg) e in ordinate i corrispondenti valori di assorbanza.

8. Calcoli

La concentrazione della silice solubile e/o colloidale si ottiene dalla formula:

$$SiO_2\ (mg/L) = \frac{m}{V}$$

dove:
m = µg SiO_2 letti sulla curva di taratura in base al valore di assorbanza misurata, dopo sottrazione del valore dell'assorbanza del bianco;
V = volume (mL) di campione prelevato per la determinazione.

9. Qualità del dato

Prove effettuate (n=7) da un singolo laboratorio su soluzioni sintetiche di acqua deionizzata hanno mostrato, per valori di concentrazione in silice compresi tra 0,1 e 0,8 mg/L, valori del coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100, inferiori all'8%.
Va tenuto presente che la precisione di un metodo generalmente peggiora all'aumentare della complessità della matrice.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA).

4140. Solfato

I solfati presenti in natura derivano in larga misura dalla trasformazione dei solfuri naturali. Si ritrovano prevalentemente nei sedimenti evaporitici come gesso ($CaSO_4 \cdot 2H_2O$) o anidride ($CaSO_4$). Altri importanti minerali sono la kieserite ($MgSO_4 \cdot H_2O$), la epsomite ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), l'anglesite ($PbSO_4$) ed il sodio solfato (Na_2SO_4).
Un importante veicolo di diffusione dei solfati nell'ambiente sono le emissioni gassose di ossidi di zolfo (SO_2, SO_3), causate da numerose attività (consumo di combustibili per uso energetico, produzioni industriali, ecc.). Tra i solfati di maggior interesse industriale, il sodio solfato ($Na_2SO_4 \cdot 10H_2O$) viene impiegato nell'industria vetraria, in tintoria e nella produzione di cellulosa, l'ammonio solfato [$(NH_4)_2SO_4$] viene impiegato come fertilizzante, il magnesio solfato ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) trova applicazione nell'industria della carta e tessile, il calcio solfato ($CaSO_4 \cdot 2H_2O$) viene usato in edilizia ed infine il rame solfato ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) è impiegato come anticrittogamico e nei processi galvanoplastici.
Gli anioni solfato sono chimicamente stabili in soluzioni acquose aerate, mentre in condizioni anossiche vengono ridotti, per via chimica e microbiologica, a zolfo elementare (a pH 7) o a ioni idrogeno solfuro (HS^-).
Nelle acque superficiali le concentrazioni sono strettamente legate alle caratteristiche litologiche del bacino drenato. In bacini silicei le concentrazioni non superano solitamente i 10 mg/L, mentre in bacini gessosi possono raggiungere valori medi di 50 mg/L. In acqua di mare il contenuto medio di solfati è di 2,7 g/L.
Per il dosaggio degli ioni solfato nelle acque vengono presentati due metodi:

A - metodo gravimetrico
B - metodo torbidimetrico

La scelta di uno piuttosto che l'altro dipende dalla concentrazione del solfato nel campione in esame e dall'accuratezza richiesta.

METODO A - Determinazione gravimetrica

1. Principio del metodo

Il solfato viene precipitato in ambiente acido per acido cloridrico come solfato di bario. La precipitazione viene eseguita ad una temperatura vicina a quella di ebollizione e, dopo un periodo di digestione, il precipitato viene filtrato, lavato con acqua esente da cloruri, seccato, calcinato e pesato come $BaSO_4$.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile alle acque naturali (superficiali, sotterranee e salmastre), alle acque trattate, ed agli scarichi domestici ed industriali. Esso può essere impiegato direttamente per un intervallo di concentrazione di solfato compreso tra 100 e 200 mg/L.

3. Interferenze e cause di errore

Interferisce la presenza di silice, di sostanze in sospensione e di sostanze insolubili che debbono essere eliminate. Interferiscono anche tutti quegli ioni che possono essere adsorbiti od occlusi nel precipitato. Solfiti e solfuri possono interferire a seguito di un processo di ossidazione.
Se la concentrazione della silice è maggiore di 25 mg/L, il campione viene evaporato fino a secchezza in una capsula di platino (o anche di porcellana). Aggiungere quindi 1 mL di acido cloridrico concentrato, inclinare la capsula e ruotarla per consentire all'acido di venire a contatto con tutto il residuo; continuare l'evaporazione fino a secchezza. Completare eventualmente l'essiccazione in stufa a 180°C. Riprendere con 2 mL di HCl e ripetere l'operazione. Riprendere con acqua e filtrare. L'analisi si esegue sul filtrato.
Se la concentrazione totale dei cationi nel campione è superiore a 250 mg/L, o se la concentrazione degli ioni di metalli pesanti è superiore a 10 mg/L, per evitare fenomeni di coprecipitazione è consigliabile eliminare i cationi facendo fluire il campione in esame attraverso una colonna di resina cationica forte in forma acida, tipo Dowex 50.
In presenza di solfiti e solfuri occorre effettuare una ossidazione preventiva con perossido d'idrogeno. In un'aliquota a parte si determina il contenuto di solfuri e solfiti che viene detratto.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il prelievo e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".
Il campione deve essere conservato in bottiglie di vetro neutro oppure di plastica, completamente piene e ben tappate, alla temperatura di 4°C.

5. Apparecchiature

Normale attrezzatura di laboratorio.

5.1 Crogiolo di platino (o di porcellana)

6. Reattivi

Si debbono utilizzare solo reattivi puri per analisi.

6.1 Acqua esente da solfati e cloruri

Per la preparazione dei reattivi è opportuno impiegare acqua bidistillata o deionizzata e distillata.

6.2 Soluzione di indicatore al metilarancio

Sciogliere 0,05 g di metilarancio in acqua e diluire a 100 mL.

6.3 Acido cloridrico 1+1

Diluire un volume di acido cloridrico (HCl) (d=1,19) con un ugual volume di acqua.

6.4 Soluzione di cloruro di bario

Sciogliere 100 g di cloruro di bario ($BaCl_2 \cdot 2H_2O$) in un litro d'acqua.

6.5 Reattivo nitrato d'argento-acido nitrico

Sciogliere 8,5 g di nitrato d'argento ($AgNO_3$) e 0,5 mL di acido nitrico (HNO_3) concentrato (d=1,40) in 500 mL di acqua.

6.6 Acido fluoridrico concentrato (HF) al 48-50%

7. Procedimento

Filtrare l'acqua in esame, se torbida, su filtro a filtrazione lenta. Prelevare un'aliquota d'acqua il cui contenuto di ione solfato sia di circa 40 mg. Aggiungere qualche goccia di indicatore (6.2) e quindi acido cloridrico (6.3) fino a viraggio. Portare il volume a 200÷300 mL per diluizione con acqua o per evaporazione.
Aggiungere ancora 2 mL di acido cloridrico (6.3).
Riscaldare il campione quasi all'ebollizione e sotto agitazione aggiungere lentamente la soluzione bollente di cloruro di bario (6.4) fino a precipitazione completa.
Aggiungere ancora altri 2 mL di soluzione di cloruro di bario (6.4) vicino all'ebollizione.
Far digerire il precipitato bianco di solfato di bario a 80÷90°C, preferibilmente per una notte intera, ma comunque per non meno di due ore.
Filtrare quantitativamente per filtrazione lenta attraverso un filtro di carta per analisi e lavare il precipitato con acqua calda fino a che le acque di lavaggio siano praticamente esenti da cloruri, dopo verifica con il reattivo acido nitrico-nitrato d'argento (6.5).
Seccare il filtro con il precipitato e trasferire il tutto in un crogiolo di platino (5.1) portato a peso costante; carbonizzare il filtro lentamente evitando che s'infiammi mantenendo il crogiolo inclinato. Calcinare quindi a 800°C per circa un'ora, avendo cura che il carbone sia completamente scomparso.
Raffreddare e aggiungere qualche goccia di acido fluoridrico (6.6). Calcinare di nuovo a 800°C, raffreddare in essiccatore e pesare fino a peso costante. Se la silice non è presente o se è stata preventivamente eliminata (vedi Capitolo 3), il trattamento con acido fluoridrico non si rende necessario; in tal caso, la calcinazione del precipitato può essere eseguita in crogiolo di porcellana.

8. Calcoli

La concentrazione (C) dello ione solfato è data dall'espressione:

$$C(mg/L) = \frac{P \cdot f}{V}$$

dove:
P = peso (mg) di solfato di bario;
V = volume (L) di campione;
f = rapporto tra il peso molecolare del solfato (SO_4^{2-}) e il peso molecolare del solfato di bario.

9. Qualità del dato

Determinazioni effettuate (n=5) da un singolo laboratorio su soluzioni sintetiche di acqua deionizzata contenenti 250 mg/L di SO_4^{2-} hanno fornito un coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100, pari al 5% ed un'accuratezza del 2%.

METODO B - Determinazione torbidimetrica

1. Principio del metodo

Lo ione solfato viene precipitato in ambiente acido per acido cloridrico con cloruro di bario. La sospensione omogenea di solfato di bario che in tal modo si forma viene stabilizzata per mezzo delle soluzioni di glicerina e cloruro di sodio. Con uno spettrofotometro si misura l'assorbanza della sospensione e si risale alla concentrazione incognita mediante una curva di taratura ottenuta trattando quantità note di solfato nelle stesse condizioni del campione.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile alle acque naturali (superficiali, sotterranee e salmastre), alle acque trattate, ed agli scarichi domestici ed industriali (vedi Capitolo 3). Esso è più rapido del metodo gravimetrico e può essere impiegato in un intervallo di concentrazione compreso tra 10 e 50 mg/L. Si possono determinare concentrazioni inferiori a 10 mg/L utilizzando il metodo delle aggiunte standard (1-10 mg/L).

3. Interferenze e cause di errore

Interferiscono sostanze in sospensione, sostanze colorate, sostanze organiche, elettroliti, se presenti ad elevate concentrazioni, silice, solfuri e solfiti.
Le sostanze in sospensione possono essere allontanate per filtrazione. L'interferenza delle specie colorate o delle sostanze organiche disciolte può essere eliminata per filtrazione su colonna di carbone attivo. Si può ovviare all'interferenza degli elettroliti effettuando la determinazione con il metodo delle aggiunte.
La solubilità del $BaSO_4$ rende critica la determinazione del solfato a concentrazioni inferiori a 10 mg/L, se non viene utilizzato il metodo delle aggiunte.
L'interferenza dovuta alla silice, ai solfuri e ai solfiti viene rimossa seguendo il procedimento indicato al Capitolo 3 del metodo A.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il prelievo e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".
Il campione deve essere conservato in bottiglie di vetro neutro o di plastica, completamente piene e ben tappate, alla temperatura di 4°C.

5. Apparecchiature

5.1 Normale attrezzatura di laboratorio

5.2 Spettrofotometro dotato di celle con cammino ottico di 4 o 5 cm.

6. Reattivi

I reattivi debbono essere di grado analitico e l'acqua usata deve essere bidistillata o deionizzata e distillata.

6.1 Soluzione di glicerina (1:1)

Miscelare un volume di glicerina con un volume di acqua. La soluzione va preparata 24 ore prima di effettuare le analisi e non si conserva.

6.2 Acido cloridrico concentrato (HCl, d=1,19)

6.3 Soluzione di cloruro di sodio (NaCl)

Sciogliere 200 g di cloruro di sodio in acqua contenente 40 mL di HCl (6.2) e portare a un litro con acqua.

6.4 Soluzione di glicerina e cloruro di sodio

Miscelare due volumi di glicerina (6.1) con un volume di cloruro di sodio (6.3).

6.5 Soluzione di cloruro di bario ($BaCl_2 \cdot 2H_2O$)

Sciogliere 90 g di cloruro di bario in un litro di acqua.

6.6 Soluzione di riferimento di solfato (Na_2SO_4, 0,1 g/L SO_4^{2-})

Pesare 0,1479 g di solfato di sodio anidro, previamente essiccato per un'ora in stufa a 110°C. Sciogliere in acqua e portare a un litro in un matraccio tarato.

7. Procedimento

7.1 Taratura

Prelevare, ad esempio, 5 mL; 10 mL; 15 mL; 20 mL e 25 mL di soluzione (6.6) e portare a volume con acqua in matracci tarati da 50 mL. Le soluzioni così preparate contengono rispettivamente 10 mg/L; 20mg/L; 30 mg/L; 40 mg/L e 50 mg/L di SO_4^{2-}. Preparare inoltre un bianco con 50 mL di acqua deionizzata. Seguire il procedimento descritto per il campione (7.2). Riportare in grafico i valori di assorbanza misurati in corrispondenza delle concentrazioni di solfato delle soluzioni di taratura. Ripetere la taratura per ogni ciclo di analisi.

7.2 Dosaggio del campione

Prelevare 30 mL di campione e trasferirli in una beuta da 100 mL, introdurre un'ancoretta magnetica e aggiungere 10 mL della soluzione (6.4). Si consiglia di utilizzare ancorette uguali per tutti i campioni. Iniziare l'agitazione, che va mantenuta costante ed uguale per tutte le analisi, e aggiungere 5 mL della soluzione di cloruro di bario (6.5). Continuare l'agitazione per 2 minuti, quindi lasciare a riposo il campione per 15 minuti. Agitare nuovamente la soluzione per 15 secondi, trasferirne un'aliquota nella cella dello spettrofotometro ed eseguire la lettura dell'assorbanza rispetto al bianco. La lunghezza d'onda consigliata è compresa nell'intervallo 380- 400 nm.

8. Calcoli

Dal valore dell'assorbanza del campione, corretta del valore del bianco, risalire alla concentrazione di SO_4^{2-} utilizzando la curva di taratura.

9. Qualità del dato

Prove effettuate (n=7) da un singolo laboratorio su soluzioni sintetiche di acqua deionizzata contenenti 10 mg/L di solfato hanno fornito un valore del coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100, pari al 2% ed un'accuratezza del 12%.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA).

ASTM (1988): "*Annual Book of ASTM Standard*", Vol. 11.01, Water (1) D-516-828 (Philadelphia).

IRSA (1986): "Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **75**, 489-490.

TREADWELL F.P. (1966): "*Chimica Analitica*", II Vol., 6ª/7ª ed. (F. Vallardi. Milano), p. 515.

4150. Solfito

I composti dello zolfo nello stato di ossidazione (IV) sono instabili, per cui in natura non si trovano minerali dell'anione solfito. Le spiccate proprietà riducenti dei solfiti, unite alla solubilità dei loro sali rendono abbastanza diffuso l'utilizzo industriale di questi composti (sodio solfito nell'industria fotografica e nella conservazione degli alimenti; idrogeno solfito di sodio in tintoria, idrogeno solfito di calcio nell'industria della cellulosa).
La tossicità dei solfiti è legata al pH del mezzo e diminuisce all'aumentare del pH, in quanto lo ione HSO_3^- è più tossico dello ione SO_3^{2-}.

METODO A - Determinazione iodometrica

1. Principio del metodo

Il metodo è basato sull'ossidazione, previa acidificazione, del solfito presente nel campione in esame mediante una soluzione a concentrazione nota di iodato e ioduro di potassio e successiva titolazione dello iodio in eccesso con tiosolfato. Il punto finale della titolazione viene rilevato utilizzando salda d'amido come indicatore oppure con un metodo elettrometrico.

2. Campo di applicazione

Questo metodo consente il dosaggio del solfito in acque naturali e di scarico (urbane e industriali). Utilizzando l'apparecchiatura elettrometrica il metodo può essere applicato nell'intervallo 0,1-5 mg/L; per concentrazioni superiori è sufficiente ricorrere alla salda d'amido per apprezzare il punto finale della titolazione.

3. Interferenze e cause di errore

Sostanze riducenti, quali ad esempio solfuri e ferro (II) o sostanze organiche vengono ugualmente titolate con questo metodo; in loro presenza si ottengono quindi valori in eccesso rispetto alla concentrazione di solfito effettivamente presente. L'interferenza dovuta ai solfuri può essere eliminata mediante aggiunta di una soluzione di acetato di zinco (1,5 mL/L di campione) e di una soluzione di idrossido di sodio 6 M (1 mL/L). Questi reattivi producono, infatti, a pH>9 la precipitazione come ZnS dei solfuri, i quali possono essere rimossi attraverso una semplice filtrazione su filtro in fibra di vetro. Sul campione filtrato si procede alla determinazione del solfito come descritto nel Paragrafo 7.1. Durante la filtrazione evitare di lasciare la soluzione a contatto con l'aria. È necessario operare la filtrazione sotto pressione di azoto.
Alcuni ioni metallici (es. Cu^{2+}, Co^{2+}) catalizzano l'ossidazione di solfito a solfato quando il campione viene esposto all'aria fornendo risultati in difetto. L'aggiunta di EDTA al campione al momento del prelievo (1 mL/100 mL di campione) elimina l'interferenza suddetta ed anche quella dovuta al Fe (II).
Risultati in difetto si ottengono in presenza di nitrito, che reagisce con il solfito in ambiente acido; tale interferenza può essere rimossa aggiungendo acido solfammico al campione.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il prelievo e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".
In particolare sia durante il prelievo che durante le successive manipolazioni, il campione dovrà rimanere esposto all'aria il più breve tempo possibile per evitare l'ossidazione dei solfito a solfato.

5. Apparecchiature

5.1 Normale attrezzatura di laboratorio e burette graduate a 1/10 di mL

5.2 Apparecchiatura elettrometrica, corredata da elettrodi di platino. Il dispositivo deve essere sensibile all'aggiunta di 0,05 mL di $Na_2S_2O_3$ 0,005 N a 500 mL di acqua.

6. Reattivi

Per la preparazione delle soluzioni dei reattivi e per le diluizioni impiegare acqua distillata e/o deionizzata.

6.1 Acido cloridrico concentrato (HCl) (d=1,19)

6.2 Iodato di potassio, solido (KIO_3)

6.3 Idrogenocarbonato di sodio, solido ($NaHCO_3$)

6.4 Carbonato di sodio, solido (Na_2CO_3)

6.5 Dicromato di potassio, solido ($K_2Cr_2O_7$)

6.6 Soluzione di acido cloridrico (1+1)

Aggiungere un volume di acido cloridrico concentrato (6.1) a un uguale volume di acqua.

6.7 Soluzioni di iodato di potassio 0,025 N e 0,05 N

Sciogliere 0,8920 g di iodato di potassio (6.2) previamente essiccato a 120°C per 4 ore, e 0,5 g di idrogeno carbonato di sodio (6.3) in acqua, agitare fino a completa dissoluzione e diluire a 1000 mL (soluzione 0,025 N) o a 500 mL (soluzione 0,05 N) con acqua in matraccio tarato.

6.8 Soluzione di ioduro di potassio (50 g/L)

Sciogliere 50 g di ioduro di potassio (KI) e 0,5 g di idrogenocarbonato di sodio (6.3) in acqua e portare a volume in un matraccio tarato da 1 litro. Lo ioduro di potassio impiegato dovrà essere esente da iodato. Per verificare l'assenza di tracce di iodato, sciogliere 1 g di ioduro di potassio in 20 mL di acqua, addizionare 5 gocce di acido solforico 1 N e 1 mL di soluzione di salda d'amido (6.12) preparata di recente. Non deve comparire la caratteristica colorazione blu.

6.9 Soluzione concentrata di tiosolfato di sodio 0,1 N

Sciogliere 24,82 g di tiosolfato di sodio ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) in circa 800 mL di acqua. Stabilizzare la soluzione sciogliendovi 1 g di carbonato di sodio (6.4) e portare a volume in matraccio tarato da 1000 mL.

Il controllo del titolo di questa soluzione viene effettuato con dicromato di potassio nel modo seguente:
Sciogliere 2 g di iodato di potassio (6.2) esente da ioduro di potassio e 2 g di idrogenocarbonato di sodio (6.3) in circa 300 mL di acqua; addizionare lentamente acido cloridrico concentrato (6.1) agitando finché non cessi lo sviluppo di anidride carbonica.
Addizionare altri 10 mL di acido cloridrico concentrato, mescolare e sciogliere 0,098 g di dicromato di potassio (6.5) precedentemente essiccato in stufa a 110°C per circa 2 ore. Lavare con una piccola quantità d'acqua le pareti della beuta e lasciare a riposo per circa 10 minuti.
Titolare quindi la soluzione usando come indicare la soluzione di salda d'amido (6.11) fino al viraggio del colore dal blu al verde del sale cromico.
La normalità della soluzione di tiosolfato di sodio si calcola nel modo seguente:

$$N = \frac{g \cdot 1000}{49{,}04 \cdot V}$$

dove:
N = normalità della soluzione di tiosolfato di sodio;
g = grammi di dicromato di potassio impiegati;
V = volume (mL) di soluzione di tiosolfato di sodio impiegato nella titolazione;
49,04 = peso equivalente del dicromato.

6.10 Soluzioni diluite di tiosolfato di sodio 0,005 N e 0,01 N

Trasferire 25 mL o 50 mL della soluzione concentrata di tiosolfato 0,1 N (6.9) in un matraccio tarato e diluire a 500 mL con acqua per ottenere, rispettivamente, una soluzione 0,005 N o 0,01 N di tiosolfato. Queste soluzioni devono essere preparate non più di 12 ore prima del loro impiego.

6.11 Soluzione di salda d'amido

Porre in un mortaio 5-6 g di amido e alcuni mL di acqua fredda. Macinare la pasta risultante, che viene poi versata in 1000 mL di acqua bollente. Far bollire per pochi minuti e lasciar depositare una notte. Utilizzare il liquido sovrastante. La soluzione può essere stabilizzata aggiungendo, per ogni litro, circa 1 g di acido salicilico.

6.12 Soluzione di acetato di zinco (220 g/L)

Sciogliere 220 g di acetato di zinco diidrato [$Zn(CH_3COO)_2 \cdot 2H_2O$] in acqua e portare a volume in un matraccio tarato da 1 litro.

6.13 Soluzione di idrossido di sodio 6 M

Sciogliere 24 g di idrossido di sodio (NaOH) in pasticche in acqua e diluire a 100 mL.

6.14 Soluzione di sale disodico dell'acido etilendiamminotetracetico (EDTA)

Sciogliere 2,5 g di sale disodico dell'EDTA in acqua e portare a volume a 100 mL.

6.15 Acido solfammico, solido (NH_2SO_3H)

7. Procedimento

7.1 Titolazione con rilevamento del punto finale mediante indicatore

Trasferire un volume V (almeno 300 mL) di campione, in una beuta a tappo smerigliato sen-

za che esso venga a contatto con l'aria, agitare mediante agitatore magnetico e aggiungere nell'ordine 5 mL di acido cloridrico (6.6), 5 mL di ioduro di potassio (6.8) e 5 mL di iodato di potassio 0,05 N. Se il campione contiene più di 30 mg/L di solfito utilizzare un volume maggiore di soluzione di ioduro di potassio e di iodato di potassio.
Aggiungere quindi 1-2 mL di salda d'amido (6.11) e procedere alla titolazione con una soluzione 0,01 N di $Na_2S_2O_3$.
La prova in bianco viene effettuata su un uguale volume di acqua, trattato analogamente al campione.

7.2 Titolazione con rilevamento del punto finale mediante sistema elettrometrico

Trasferire 500 mL di campione in una beuta a tappo smerigliato senza che esso venga a contatto con l'aria, agitare mediante agitatore magnetico e aggiungere nell'ordine 5 mL di acido cloridrico (6.6), 5 mL di ioduro di potassio (6.8) e 5 mL di iodato di potassio 0,025 N.
Procedere alla titolazione con una soluzione 0,005 N di $Na_2S_2O_3$, utilizzando l'apparecchiatura elettrometrica.

8. Calcoli

La concentrazione dello ione solfito è espressa dalla formula:

$$C(mg/L) = \frac{40,12 \cdot N \cdot (a-b)}{V} \cdot 1000$$

dove:
N = normalità della soluzione di tiosolfato di sodio utilizzata per la titolazione;
a = volume (mL) di soluzione di tiosolfato impiegato per titolare il bianco;
b = volume (mL) di soluzione di tiosolfato impiegato per titolare il campione in esame;
40,12 = peso equivalente dello ione solfito;
V = volume (mL) di campione analizzato.

9. Qualità del dato

Prove effettuate in quintuplicato da tre laboratori su campioni di acque di scarico dopo aggiunta di quantità note di solfito in modo da ottenere concentrazioni comprese tra 2 e 5 mg/L, hanno fornito valori del coefficiente di variazione, CV(%) = (scarto tipo/valore medio)·100, inferiori al 15%. L'accuratezza è risultata compresa tra il 5 e il 10%.

METODO B - Determinazione cromatografica

1. Principio del metodo

Il metodo è basato sulla determinazione del solfito presente nel campione di acqua mediante cromatografia ionica. Il campione d'acqua viene iniettato in una corrente di eluente carbonato/bicarbonato (Na_2CO_3/$NaHCO_3$). Gli anioni presenti vengono separati da una resina a scambio ionico (precolonna e colonna di separazione) sulla base della loro affinità, convertiti insieme all'eluente nella forma acida (colonna di soppressione) e misurati per conducibilità. Gli anioni vengono identificati sulla base dei tempi di ritenzione e quantificati confrontando l'area del picco con la curva di taratura dell'analita costruita mediante una serie di soluzioni di riferimento a diverse concentrazioni. Il metodo consente la determinazione contemporanea di altri anioni (Br^-, Cl^-, F^-, SO_4^{2-}, NO_2^-, NO_3^-, PO_4^{3-}) presenti nel campione.

2. Campo di applicazione

Il metodo può essere applicato alle acque naturali e di scarico dell'intervallo di concentrazione compreso tra 0,1 e 10 mg/L. Detto intervallo può essere esteso fino a 100 mg/L selezionando un appropriato volume di campione o ricorrendo alla diluizione.

3. Interferenze e cause di errore

Non sono state riscontrate interferenze del solfato, presente in concentrazione 400 volte superiore al solfito (4000 mg/L SO_4^{2-}, 10 mg/L SO_3^{2-}).
Non sono state riscontrate interferenze di composti organici (ossalato, tartrato, citrato, ftalato, amminoacidi, proteine, urea, acido umico) presenti in una miscela o singolarmente a concentrazioni 5 volte superiori al solfito; i fenoli possono causare un abbassamento del segnale del solfito (del 26% in un rapporto fenolo/solfito 5:1), dovuto a una reazione di ossidazione a solfato.
In scarichi provenienti da cartiere e da alcune industrie alimentari la presenza di acidi α-idrossisolfonici (addotti tra zuccheri riducenti o aldeidi e solfiti) può comportare una sovrastima nel contenuto di solfiti.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il prelievo e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". Particolare attenzione deve essere posta nella preparazione e nella conservazione delle soluzioni di riferimento e dei campioni. Per impedire l'ossidazione del solfito a solfato si aggiunge formaldeide (6.1) 0,25 mL per litro di campione e di soluzione di riferimento. I campioni devono essere conservati refrigerati a 4°C e analizzati entro le 24 ore.

5. Apparecchiature

5.1 Normale vetreria di laboratorio. Matracci tarati da 100 mL in vetro Pyrex. Siringhe di plastica da 5 mL.

5.2 Cromatografo ionico, dotato di un rilevatore a conducibilità, con compensazione della temperatura, e di un soppressore a membrana, resina scambiatrice cationica.

5.3 Colonna di separazione anionica, a base di polistirene divinilbenzene agglomerato con lattice di scambio ionico a base di poliacrilato, solvente compatibile (tipo Dionex Ion Pack AS9-SC o equivalente).

5.4 Precolonna di protezione, come la colonna (5.3) (tipo Dionex Ion Pack AG9-SC o equivalente).

5.5 Registratore o integratore

6. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere di grado analitico. Le soluzioni devono essere preparate con acqua distillata o deionizzata a bassa conducibilità e filtrata su membrana di 0,2 µm.

6.1 Formaldeide (CH_2O), soluzione in acqua al 37%.

6.2 Soluzione concentrata di solfito (1000 mg/L)

Sciogliere 0,17631 g di sodio formaldeide bisolfito ($HOCH_2SO_3Na$) al 95% in acqua, aggiungere 2,5 mL della soluzione (6.1) e portare a volume in un matraccio tarato da 100 mL con acqua distillata.

6.3 Soluzione diluita di solfito (100 mg/L)

Introdurre 10 mL della soluzione concentrata (6.2) in un matraccio tarato da 100 mL e portare a volume con acqua. Questa soluzione va preparata giornalmente.

6.4 Carbonato di sodio anidro (Na_2CO_3)

6.5 Idrogenocarbonato di sodio ($NaHCO_3$)

6.6 Soluzione eluente (Na_2CO_3 1,8 mM/$NaHCO_3$ 1,7 mM)

Sciogliere 0,3816 g di carbonato di sodio (6.4) e 0,2856 g di idrogenocarbonato di sodio (6.5) in acqua e portare a volume in un matraccio da 2 L.

6.7 Acido solforico concentrato (H_2SO_4, d=1,84)

6.8 Rigenerante: acido solforico 0,025 N

Aggiungere 2,8 mL di acido solforico (6.7) all'acqua e portare a volume in un matraccio da 4 L.

6.9 Acido nitrico concentrato (70%, d=1,42)

7. Procedimento

Acidificare il campione filtrato con 2-3 mL/L di acido nitrico (6.9) e stabilizzarlo con 0,25 mL/L di formaldeide (6.1).

7.1 Condizioni cromatografiche

- Volume iniettato: 50 µL;
- Eluente: Na_2CO_3 1,8 mM/$NaHCO_3$ 1,7 mM;
- Flusso dell'eluente: 2 mL/min;
- Rigenerante: H_2SO_4 0,025 N;
- Flusso del rigenerante: 5 mL/min;
- Fattore di compensazione della temperatura: 1,70%/°C.

7.2 Taratura

Preparare soluzioni di taratura (es. 0,1 mg/L; 0,5 mg/L; 2,5 mg/L e 10 mg/L) diluendo opportunamente la soluzione di solfito (6.3).
Iniettare una aliquota della prima soluzione di taratura e registrare il tempo di ritenzione e l'altezza o area del picco. Ripetere l'iniezione con le altre soluzioni. In Fig. 1 è riportato a titolo esemplificativo il cromatogramma di una soluzione di riferimento multipla contenente solfito.
Tracciare il grafico di taratura ponendo in ascissa le concentrazioni della soluzione di solfito e in ordinata le altezze o aree dei picchi corrispondenti. Il solfito presenta picchi con altezza di circa la metà rispetto a quella del solfato. La differenza dei tempi di ritenzione si mantiene costante (1,7-2 minuti) nell'intervallo di concentrazioni considerato (da 0,1 a 10 mg/L).

7.3 Determinazione

Iniettare una aliquota del campione e registrare il tempo di ritenzione e l'altezza o area del picco. Le soluzioni di taratura e i campioni vanno analizzati nell'arco della giornata.

8. Calcoli

Ricavare dalla retta di taratura la concentrazione del solfito presente nel campione. In alternativa, se la risposta è lineare, ricavare la concentrazione dalla seguente formula:

$$C(mg/L) = \frac{A_c \cdot C_s}{A_s}$$

dove:
A_c = area del picco del campione;
A_s = area del picco della soluzione di riferimento;
C_s = concentrazione della soluzione di riferimento.

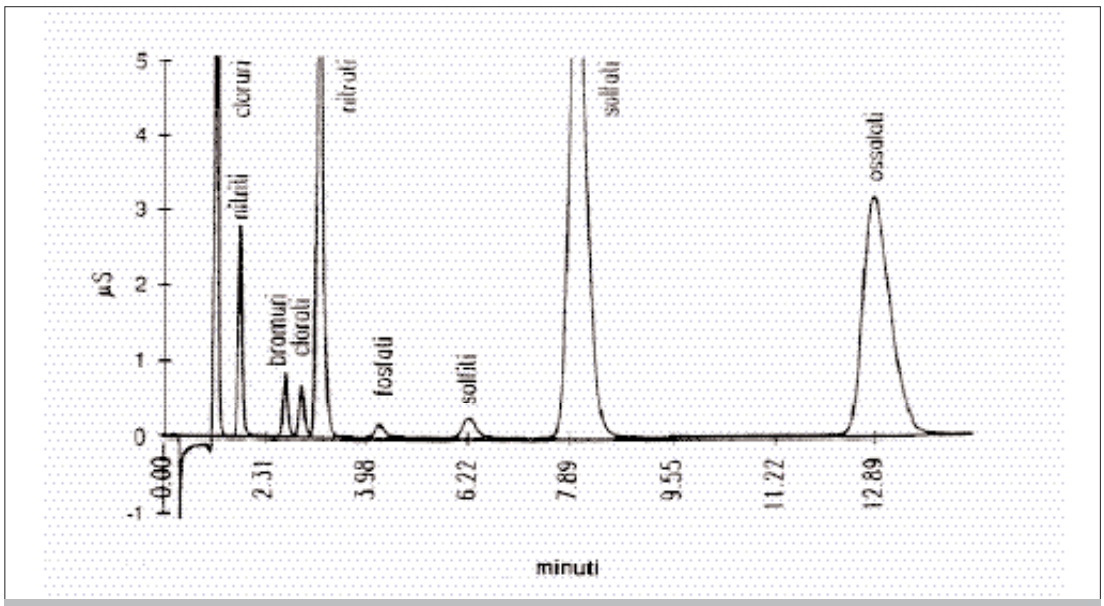


Figura 1: Cromatogramma di una soluzione di riferimento multipla. Cl (3 mg/L), N-NO_2 (0,5 mg/L), Br (1 mg/L), ClO_3 (1 mg/L), N-NO_3 (2 mg/L), P-PO_4 (0,25 mg/L), SO_3 (1 mg/L), SO_4 (15 mg/L), C_2O_4 (10 mg/L).

9. Qualità del dato

Su campioni d'acqua contenenti da 0,1 a 10 mg/L di solfito, analizzati in quintuplicato, si è ottenuto un coefficiente di variazione, CV(%) = (scarto tipo/valore medio)·100, inferiore al 2%. Su campioni di acque reflue contenenti solfato e solfito nel rapporto 400:1 (10 mg/L di solfito, 4000 mg/L di solfato), analizzati da un singolo laboratorio, si è ottenuto un coefficiente di variazione del 5,5%. In un esercizio di interconfronto tra 7 laboratori su un campione sintetico (0,85±0,02 mg/L di solfito) si è ottenuto un coefficiente di variazione dell'8%. I limiti di rivelabilità sono di 0,02 mg/L e di 0,05 mg/L rispettivamente come limite di determinazione e di quantificazione (secondo IUPAC).

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1992): *"Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater"*, Method 4110B, XX Ed. (Washington, APHA), 4-2/4-6.

ASTM (1988): *"A annual Book of ASTM Standards"*, 11.01, Water(1), D4327-88, (Philadelphia).

GRADOS N., CAMPANELLA L., CALDARELLI E. & MAJONE M. (1986): "Determinazione del solfito nelle acque mediante cromatografia ionica", *Notiziario IRSA Metodi Analitici per le Acque*, **6**, (4), 33-47.

IRSA (1986): "Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **75**, 493.

KURTENACKER A. (1924): "The aldehyde-bisulfite reaction in mass analysis", *Z. Anal. Chem.*, **64**, 56.

UNI EN ISO 10304-3 (2000): *Qualità dell'acqua: Determinazione di anioni disciolti per cromatografia ionica in fase liquida – Determinazione di cromato, ioduro, solfito, tiocianato e tiosolfato.*

VALSECCHI S. & TARTARI G. (1992): "Determinazione di alcune specie anioniche in cromatografia ionica", *Notiziario IRSA Metodi Analitici per le Acque,* **12**, (1), 1-12.

4160. Solfuro

Tra i principali solfuri presenti in natura, particolare menzione meritano alcuni minerali di importante uso come materie prime per l'estrazione di metalli: blenda (ZnS), galena (PbS), pirite (FeS_2), calcopirite ($Cu_2Fe_2S_4$) e cinabro (HgS). In natura esiste libero anche l'acido solfidrico, esso viene prodotto nei processi anaerobici di decomposizione del materiale organico e costituisce uno dei principali componenti volatili emessi nei processi vulcanici. Elevate concentrazioni di solfuri si possono trovare nelle acque di falda di zone vulcaniche, generalmente in associazione al ferro.
Accanto ai prodotti di scarto della lavorazione dei minerali per uso metallurgico, alcuni processi industriali costituiscono importanti sorgenti di solfuri (produzione di gas di città, del raion e desolforazione dei prodotti dell'industria petrolchimica). I reflui di diverse industrie (alimentari, carta, ecc.) sono, infine, fra le principali fonti di solfuri nelle acque naturali.
I solfuri possono formare composti ionici e non ionici. Normalmente i solfuri metallici formano composti a carattere covalente, dotati di una spiccata insolubilità in acqua; solo i solfuri dei metalli alcalini ed alcalino terrosi, composti a carattere ionico, sono solubili in acqua.
Nelle acque lacustri ossigenate non si riscontrano ioni solfuro, la loro presenza, determinata dalla riduzione dei solfati, si riscontra solo in condizioni anossiche nelle acque ipolimniche di laghi ad elevata trofia. In acque fluviali la presenza di solfuri può essere legata ad occasionali immissioni industriali o a situazioni di elevato carico organico in grado di rendere anossiche le acque.

1. Principio del metodo

Il metodo prevede l'ossidazione dello ione solfuro mediante una soluzione di iodio in presenza di acido cloridrico concentrato. L'eccesso di iodio viene titolato con una soluzione di tiosolfato di sodio.

2. Campo di applicazione

Il metodo consente la determinazione del solfuro disciolto e del solfuro totale (disciolto+sospeso sotto forma di solfuro metallico) in acque sotterranee, superficiali (comprese le acque di mare), in scarichi domestici e industriali nell'intervallo di concentrazione 1-100 mg/L.

3. Interferenze e cause di errore

Interferiscono sostanze riducenti che reagiscono con lo iodio come tiosolfati, solfiti e composti organici. L'interferenza può essere rimossa trattando il campione con una soluzione di acetato di zinco (1,5 mL/L di campione) e una soluzione di idrossido di sodio 6 M (1 mL/L di campione) a pH>9. Si ottiene la precipitazione dei solfuri come ZnS, si filtra il precipitato su filtro in fibra di vetro, si recupera il precipitato con acqua e si porta al volume originario del campione. Si procede alla determinazione come descritto nel Paragrafo 7.1.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".

All'atto del prelievo del campione occorre limitare al massimo il contatto con l'aria sia perchè l'acido solfidrico è volatile sia perché esso può venire ossidato dall'ossigeno. I campioni destinati all'analisi del solfuro totale (che possono quindi contenere anche solidi sospesi) vanno stabilizzati con acetato di zinco (2 mL di soluzione 2 M per litro di campione) che causa la precipitazione di solfuro di zinco, mentre quelli relativi alla determinazione del solfuro disciolto devono essere analizzati entro tre minuti dal momento del prelievo.

5. Apparecchiature

5.1 Normale attrezzatura di laboratorio

6. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e l'acqua indicata nel seguito deve essere deionizzata e distillata.

6.1 Soluzione di acetato di zinco 2 M (220 g/L)

Sciogliere 220 g di acetato di zinco diidrato $Zn(C_2H_3O_2)_2 \cdot 2H_2O$ in acqua e portare a volume in matraccio tarato da 1 litro.

6.2 Acido solforico concentrato (H_2S0_4, d=1,84)

6.3 Soluzione di iodio 0,025 N

Sciogliere 20-25 g di ioduro di potassio (KI) in poca acqua e aggiungere 3,174 g di iodio (I_2). Dopo che lo iodio si è sciolto, diluire ad 1 litro e titolare con tiosolfato di sodio 0,025 N usando salda d'amido come indicatore.

6.4 Acido cloridrico concentrato (HCl, d=1,19)

6.5 Soluzione di tiosolfato di sodio 0,025 N

Sciogliere 6,205 g di tiosolfato di sodio pentaidrato ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) in acqua e diluire a 1 L. La soluzione può essere stabilizzata con 5 mL di cloroformio o 0,4 g di NaOH e quindi titolata con $KH(IO_3)_2$.
Per tale titolazione preparare una soluzione 0,0021 M di $KH(IO_3)$ pesando 0,8124 g del sale seccato a 110°C e sciogliendoli in 1 L di acqua; introdurre in un beaker 1-2 g di ioduro di potassio sciogliendoli in poca acqua; aggiungere alcune gocce di H_2SO_4 concentrato e 20 mL della soluzione di idrogenoiodato di potassio. Diluire a 200 mL e titolare lo iodio sviluppatosi con la soluzione di tiosolfato (6.5) fino ad ottenere un colore giallo paglierino. Aggiungere la salda d'amido e continuare a titolare fino a scomparsa del colore azzurro.

6.6 Salda d'amido

Preparare in un mortaio una emulsione di salda solubile (5-6 g) con poca acqua e travasare il tutto in un litro di acqua bollente. Dopo qualche minuto di ebollizione, lasciare a riposo tutta una notte e quindi utilizzare il liquido limpido sovrastante, al quale come antifermentativo possono aggiungersi 1,25 g di acido salicilico o poche gocce di toluene.

6.7 Soluzione di cloruro di alluminio (694 g/L)

Sciogliere 694 g di cloruro di alluminio esaidrato ($AlCl_3 \cdot 6H_2O$) (contenuto in recipiente sigillato, poiché il prodotto è molto igroscopico) in 1 L di acqua.

6.8 Soluzione di idrossido di sodio 6 M

Sciogliere 24 g di idrossido di sodio (NaOH) in pasticche in acqua e diluire a 100 mL.

7. Procedimento

7.1 Determinazione del solfuro totale

Porre in una beuta da 500 mL un eccesso noto di iodio (1,00 mL di soluzione di iodio 0,025 N è equivalente a 0,400 mg di solfuro), e aggiungere, se necessario, acqua fino ad ottenere un volume di circa 20 mL.
Acidificare con 1 mL di acido cloridrico concentrato (6.4), tappare ed agitare; aggiungere 200 mL di campione. Se il colore dello iodio scompare aggiungere altro iodio. L'eccesso di iodio è retrotitolato con tiosolfato 0,025 N (6.5) usando salda d'amido come indicatore. Al fine di ottenere una maggiore accuratezza, specie per piccole concentrazioni in solfuro, è opportuno fare una prova in bianco sui reagenti.

7.2 Determinazione del solfuro disciolto

Prima di procedere come descritto nel paragrafo precedente separare per sedimentazione i solfuri sospesi facendoli flocculare per aggiunta di cloruro di alluminio e idrossido di sodio.
Riempire pertanto con il campione una bottiglia da un litro, aggiungere 2 mL di soluzione di cloruro di alluminio (6.7), 2 mL di soluzione di idrossido di sodio (6.8) e tappare in modo che non rimangano bolle di aria. Le quantità dei reagenti possono essere variate in base all'esperienza ma il loro rapporto deve rimanere costante.
Agitare vigorosamente per almeno un minuto al fine di realizzare una flocculazione completa. Lasciare poi sedimentare fino a che il liquido sovrastante è ragionevolmente chiaro (in genere bastano 15 minuti); sifonare un volume opportuno di tale liquido che viene analizzato come precedentemente descritto (7.1).

7.3 Determinazione dell'acido solfidrico non ionizzato

Dalla determinazione del solfuro disciolto, noto il pH del campione originale, si può risalire facilmente alla concentrazione dell'acido solfidrico non ionizzato. La seguente tabella consente di ottenere rapidamente questa concentrazione, moltiplicando quella del solfuro disciolto per un fattore opportuno (la temperatura deve essere intorno ai 25°C):

pH	Fattore	pH	Fattore	pH	Fattore
5,0	0,99	6,8	0,55	7,7	0,13
5,4	0,97	6,9	0,49	7,8	0,11
5,8	0,92	7,0	0,44	7,9	0,089
6,0	0,89	7,1	0,38	8,0	0,072
6,2	0,83	7,2	0,33	8,2	0,046
6,4	0,76	7,3	0,28	8,4	0,030
6,5	0,71	7,4	0,24	8,8	0,012
6,6	0,66	7,5	0,20	9,2	0,0049
6,7	0,61	7,6	0,16	9,6	0,0019

8. Calcoli

Per calcolare la concentrazione del solfuro totale o del solfuro disciolto utilizzare la seguente formula:

$$S^{2-}(mg/L) = \frac{(a \cdot N_I - b \cdot N_T) \cdot 16 \cdot 1000}{V}$$

dove:
a = volume (mL) di soluzione di iodio impiegato nella titolazione;
b = volume (mL) di soluzione di tiosolfato impiegato nella titolazione;
N_I = normalità della soluzione di iodio;
N_T = normalità della soluzione di tiosolfato;
V = volume (mL) di campione prelevato;
16 = peso equivalente del solfuro.

9. Qualità del dato

Determinazioni effettuate (n=7) da un singolo laboratorio su soluzioni sintetiche di acqua deionizzata contenenti 10 mg/L di solfuro hanno fornito una precisione, espressa come scarto tipo, pari a 0,1 mg/L.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA).

IRSA (1986): "Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **75**, 495-497.

5000 - COSTITUENTI ORGANICI

La determinazione del materiale organico nelle acque può essere effettuata attraverso due differenti tipi di misure:

- misure adatte alla quantificazione di sostanze aventi caratteristiche comuni;
- misure adatte alla quantificazione di singole sostanze.

Premesso che la determinazione di singole sostanze non ha bisogno di particolari commenti, occorre precisare che alcuni parametri, come ad esempio il carbonio organico e la richiesta chimica di ossigeno, possono essere utilizzati per stabilire la quantità totale di sostanze organiche presenti.
Di queste, una frazione importante è rappresentata dalla richiesta biochimica di ossigeno, che può essere impiegato come indice del materiale organico biodegradabile.
Altri parametri, come i grassi e oli animali e vegetali e gli idrocarburi totali, rappresentano le sostanze organiche estraibili con solvente non polare, a loro volta separabili mediante passaggio su colonna impaccata di gel di silice.
I metodi descritti in questa sezione prevedono l'impiego delle seguenti tecniche:

- spettrofotometria di assorbimento molecolare nella regione del visibile;
- spettrofotometria infrarossa;
- gascromatografia;
- gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa;
- cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC);
- volumetria;
- potenziometria.

Queste tecniche sono ampiamente descritte nella parte generale (Sezione 1020), dove sono anche riportati i metodi di campionamento e conservazione dei campioni (Sezione 1030).

Esistono molte raccomandazioni sull'uso in sicurezza di strumentazione analitica e di reattivi di laboratorio. Data la diversità di tipologie e modelli di strumenti e l'elevato numero di reattivi utilizzati nei singoli metodi proposti in questa sezione del manuale, non è possibile in questa sede operare una lista di tutte le possibili avvertenze. Pertanto, si rimanda alla consultazione dei manuali d'uso dei singoli strumenti e delle schede di sicurezza dei singoli reattivi nonché alla lettura delle frasi di rischio riportate sulle etichette degli imballaggi delle sostanze e preparati utilizzati.
Solo in alcuni casi particolari si è provveduto ad esplicitare, all'interno del singolo metodo, particolari avvertenze sulla sicurezza d'uso della strumentazione e dei reattivi. Comunque tutte le operazioni analitiche devono essere effettuate nel rispetto delle disposizioni stabilite dalla normativa sulla sicurezza nei luoghi di lavoro.

5010. Aldeidi (Composti carbonilici)

Introduzione

I composti carbonilici sono inquinanti di rilevante interesse ambientale in quanto vengono generati durante i processi di ossidazione. Nelle acque naturali e di scarico, questi composti possono essere prodotti dalla foto-degradazione del materiale organico disciolto e possono essere rilasciati come metaboliti di processi microbiologici. Recentemente, i composti carbonilici di basso peso molecolare hanno ricevuto particolare attenzione in quanto è stata dimostrata la loro formazione durante i processi di disinfezione e di ossidazione.
Diversi composti carbonilici sono pericolosi per la salute umana anche quando sono presenti nelle acque a basse concentrazioni. In particolare è stato dimostrato che la formaldeide è un composto mutageno e carcinogeno mentre il gliossale può indurre tumori allo stomaco.
Nel seguito vengono descritti tre procedimenti analitici per il dosaggio di detti composti nelle acque.
Il primo (Metodo A) si basa sulla reazione di aldeidi alifatiche con il cloridrato di 3-metil-2-benzotiazolone idrazone (MBTH) e cloruro ferrico, con formazione di un derivato di colore blu, la cui assorbanza è misurata alla lunghezza d'onda di 628 nm.
Il secondo (Metodo B1) consiste in una preventiva derivatizzazione dei composti carbonilici, estrazione liquido-solido dei composti derivatizzati ed analisi successiva in cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC).
Il terzo (Metodo B2) consiste in una derivatizzazione dei composti carbonilici, estrazione liquido-liquido dei composti derivatizzati ed analisi in gascromatografia.
A differenza dei metodi cromatografici, il metodo spettrofotometrico soffre di notevoli limitazioni:

- non è adatto, per la sua scarsa sensibilità, alla determinazione di aldeidi in tracce;
- come tutti i metodi aspecifici, è scarsamente accurato e tende generalmente a sovrastimare il contenuto di aldeidi nel campione;
- non è in grado di distinguere aldeidi con diversa tossicità e quindi risulta inadatto a valutare l'impatto di questi composti sull'ambiente.

Tale metodo può essere impiegato, tuttavia, in valutazioni preliminari ("screening") sul contenuto di aldeidi in un campione acquoso o per caratterizzare effluenti a composizione chimica nota. Pertanto, limitatamente a questi ambiti di applicazione, si è ritenuto opportuno mantenere detto metodo.
Per una valutazione più accurata degli effetti di questi composti sull'ambiente si deve ricorrere all'impiego dei metodi cromatografici precedentemente indicati.

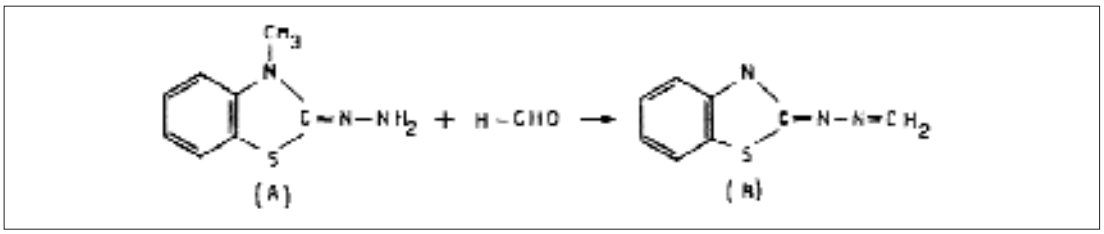
METODO A – Determinazione spettrofotometrica mediante cloridrato di 3-metil-2-benzotiazolone idrazone (MBTH)

1. Principio del metodo

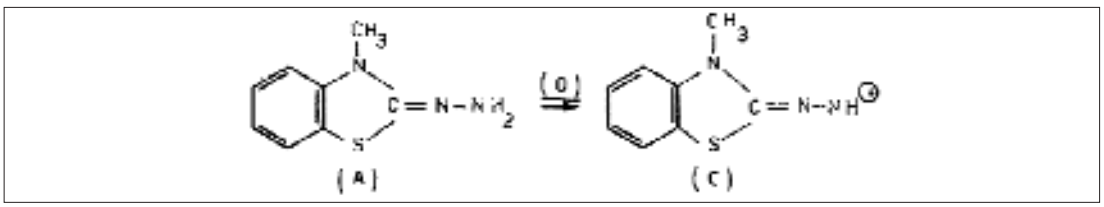
Le aldeidi alifatiche idrosolubili presenti nelle acque vengono determinate per reazione con il cloridrato di 3-metil-2-benzotiazolone idrazone (MBTH) e cloruro di ferro (III) con formazione di un derivato di colore blu.

Il meccanismo di reazione, applicato alla formaldeide, è il seguente:

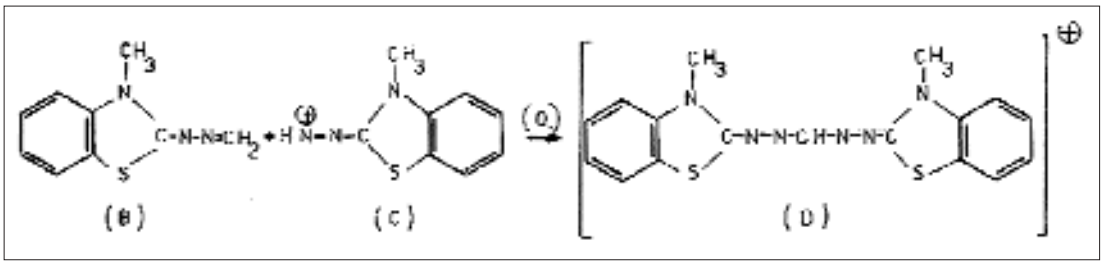
a) Reazione dell'aldeide con l'idrazone A (MBTH) per formare l'azina B.



b) Ossidazione della parte A che non ha reagito per formare il reattivo cationico C.



c) Reazione fra B e C con formazione del catione condensato D di colore blu.



Il catione colorato (D) presenta in soluzione acquosa due massimi di assorbimento: il primo a circa 625 nm, il secondo intorno a 665 mn.
Come per la determinazione dello stesso parametro nell'aria, si è ritenuto opportuno adottare la lunghezza d'onda di 628 nm.
L'assorbimento molare varia da composto a composto; è più elevato per le prime quattro aldeidi della serie alifatica e per queste la variazione è minima.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ad acque naturali e di scarico nell'intervallo di concentrazione 0,05-1 mg/L. Concentrazioni superiori possono essere rilevate diluendo il campione.

3. Interferenze e cause d'errore

Interferiscono ammine aromatiche, composti imminoeterociclici, carbazoli, stilbeni, coloranti azoici, basi di Schiff.

4. Conservazione del campione

Il campione deve essere conservato in bottiglia di vetro scuro, completamente piena e tappata, mantenuta alla temperatura di circa +4°C. Il campione va analizzato entro 48 ore dal prelievo.

5. Apparecchiature

5.1 *Spettrofotometro* munito di celle aventi cammino ottico di 1 cm.

5.2 *Normale attrezzatura di laboratorio*

6. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere del tipo puro per analisi e l'acqua distillata o deionizzata.

6.1 *Soluzione di MBTH (P.M. 215,7) allo 0,05%*

Sciogliere 0,5 g di cloridrato di 3-metil-2-benzotiazolone idrazone (MBTH) in 1000 mL di acqua.
Questa soluzione non deve essere colorata e se torbida va filtrata.
Il reattivo conservato in bottiglie di vetro scuro, alla temperatura di 4°C, è stabile una settimana.

6.2 *Soluzione ossidante*

Sciogliere 16,0 g di acido solfammico (NH_2SO_3H) e 10,0 g di $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ in 1000 mL di acqua.
La soluzione è stabile almeno un mese, se conservata a 4°C.

6.3 *Soluzione di Dimedone*

Sciogliere 1,07 g di dimedone (5,5-Dimetilcicloesan-1,3-dione) in acqua e diluire a 500 mL.

6.4 *Soluzione di riferimento di formaldeide (1000 mg/L di HCHO)*

Diluire 2,7 mL di una soluzione di formaldeide al 37-39% in peso a 1000 mL con acqua.
Il controllo del titolo viene eseguito con le seguenti modalità: introdurre in tre palloni da 100 mL 3 aliquote di 50 mL di soluzione di dimedone (6.3) ed aggiungere in ognuno di essi 10 mL della soluzione di riferimento di formaldeide (6.4). Agitare bene, tappare e lasciare a riposo almeno una notte a temperatura ambiente. Filtrare attraverso crogioli a setto poroso (tipo Gooch) precedentemente pesati. Seccare i precipitati sotto vuoto a 70°C (o a temperatura ambiente su P_2O_5) fino a peso costante.
Il titolo della soluzione (6.4) si ricava dalla seguente formula:

$$C = \frac{P \cdot 0{,}1027 \cdot 1000}{V}$$

dove:
C = concentrazione (mg/L);
P = peso (mg) del precipitato (valore medio di tre determinazioni);
0,1027 = fattore gravimetrico di conversione in formaldeide;
V = volume (mL) di soluzione di riferimento utilizzata.

6.5 *Soluzione intermedia di formaldeide (100 mg/L di HCHO)*

Introdurre 10 mL di soluzione di riferimento (6.4) in un matraccio tarato da 100 mL e portare a volume con acqua.

6.6 Soluzione diluita di formaldeide (1 mg/L di HCHO)

Introdurre 10 mL della soluzione intermedia (6.5) in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua (1 mL=1 µg di HCHO)

7. Procedimento

7.1 Taratura

Prelevare 1 mL; 2 mL; 4 mL; 8 mL e 10 mL di soluzione diluita (6.6), corrispondenti a 1 µg; 2 µg; 4 µg; 8 µg e 10 µg di HCHO, ed introdurli in cilindri graduati da 25 mL, portando a volume di 10 mL con acqua. Aggiungere 10 mL di soluzione MBTH (6.1), miscelare e dopo 1 ora aggiungere 5 mL della soluzione ossidante (6.2). Preparare secondo le stesse modalità, ma senza la soluzione diluita (6.6), una quinta soluzione di taratura (bianco).
Attendere almeno 5 minuti per consentire lo sviluppo completo del colore e misurare allo spettrofotometro le assorbanze delle soluzioni alla lunghezza d'onda di 628 nm usando celle da 1 cm di cammino ottico.
Riportare in grafico i valori di assorbanza delle soluzioni, corrette del valore del bianco, in corrispondenza dei µg di HCHO, tenendo conto delle correzioni ricavate dal controllo gravimetrico.

7.2 Dosaggio del campione

In cilindri tarati da 25 mL introdurre 10 mL di campione o una sua aliquota diluita a 10 mL e procedere come descritto al Paragrafo 7.1.

8. Calcoli

Per calcolare la concentrazione di aldeidi nel campione utilizzare la seguente formula:

$$C = \frac{a}{V}$$

dove:
C = concentrazione (mg/L) di aldeidi;
a = quantità di aldeidi (µg) ricavata dalla curva di taratura;
V = volume (mL) di campione analizzato.

9. Qualità del dato

Prove effettuate (n=7) da un singolo laboratorio su campioni di acqua di scarico contenenti 300 µg/L di HCHO hanno fornito un coefficiente di variazione [CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100] pari all'1% e un'accuratezza del 30%.

METODI B – Determinazioni cromatografiche

B1 – Determinazione mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC)

1. Principio del metodo

Il metodo si basa su una derivatizzazione dei composti carbonilici nella fase acquosa mediante reazione con dinitro-fenil-idrazina (DNPH) e successiva estrazione liquido-solido, su cartucce SPE ("solid phase extraction"), dei composti derivatizzati. I composti carbonilici derivatizzati contenuti nell'estratto organico concentrato vengono separati e rilevati mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) accoppiata ad una rivelazione spettrofotometrica nell'ultravioletto (UV).
L'analisi qualitativa dei singoli composti è basata sul confronto dei tempi di ritenzione dei picchi ottenuti nel cromatogramma del campione con quelli ottenuti da idonee miscele di riferimento. La determinazione quantitativa dei vari composti viene effettuata con le aree dei rispettivi picchi cromatografici sulla base di opportune rette di taratura di miscele di riferimento. I risultati sono di norma espressi in µg/L, per ciascun composto carbonilico.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile alle acque superficiali, sotterranee e di scarico e consente la determinazione dei composti carbonilici riportati in Tab. 1.

Tabella 1: Composti carbonilici analizzabili con il presente metodo

	Composto
1	acetaldeide
2	acetone
3	acroleina
4	benzaldeide
5	butanale
6	crotonaldeide
7	cicloesanone
8	decanale
9	2,5-dimetilbenzaldeide
10	formaldeide
11	eptanale
12	esanale
13	gliossale
14	isovalerialdeide
15	nonanale
16	ottanale
17	pentanale
18	propanale
19	m-tolualdeide
20	o-tolualdeide
21	p-tolualdeide

Per le acque superficiali e di scarico il metodo presenta un limite di rilevabilità, per ciascun composto carbonilico, inferiore a 10 µg/L.

3. Interferenze e cause di errore

Normali interferenti possono essere quei composti organici che danno luogo, durante l'analisi cromatografica, a picchi con tempi di ritenzione coincidenti con quelli dei composti in esame. Solventi, reattivi, vetreria, contaminazione dell'ambiente di lavoro ed ogni trattamento del campione possono causare la presenza di picchi interferenti e/o alterazioni della corrente di fondo del rivelatore con conseguenti difficoltà d'interpretazione del tracciato cromatografico.
Pertanto, al fine di essere sicuri che tutti i materiali utilizzati siano esenti da interferenze nelle condizioni operative adottate è buona norma, sia all'inizio dell'indagine che periodicamente, sottoporre all'intera procedura uno o più "bianchi" sostituendo al campione acqua distillata. Nel caso di evidenza d'interferenze, individuarne la provenienza analizzando ogni singolo passaggio della procedura e procedere alla loro eliminazione. Può essere richiesta una specifica selezione dei reattivi ed una purificazione dei solventi mediante distillazione.
Particolare attenzione deve essere rivolta alla formaldeide in quanto essendo ormai ubiquitario nell'ambiente può contaminare il derivatizzante. Qualora questo venga accertato, si consiglia di utilizzare una nuova confezione di derivatizzante o di purificarlo per cristallizzazione.
La vetreria da utilizzare non deve venire in contatto con acetone e con metanolo, che possono reagire con il derivatizzante dando luogo a composti interferenti.

4. Campionamento e conservazione del campione

I campioni vengono prelevati in bottiglie di vetro neutro, possibilmente scuro, con chiusura a smeriglio oppure a vite con guarnizione di teflon. Non filtrare l'acqua ed evitare ogni operazione che faciliti la perdita dei composti organici volatili disciolti. Riempire la bottiglia fino all'orlo e tappare subito evitando di lasciare spazi gassosi nei quali possono passare i componenti più volatili che vanno perduti all'apertura della bottiglia, dando risultati in difetto.
Le analisi devono essere effettuate al più presto e in ogni caso non oltre 48 ore dopo il prelievo del campione, conservando questo in frigorifero a 4°C nel periodo d'attesa.

5. Apparecchiature

5.1 HPLC

Si consiglia l'uso di uno strumento dotato di rivelatore UV a lunghezza d'onda variabile, o a serie di diodi (DAD), impostato a 360 nm e di colonna a fase inversa. La fase mobile è costituita da una miscela di acetonitrile/acqua o metanolo/acqua. L'analisi viene effettuata in gradiente la cui composizione e durata, così come il flusso di lavoro, dipende dal tipo e dalle dimensioni della colonna utilizzata.

5.2 Adsorbenti per l'estrazione SPE

Per l'estrazione liquido-solido si consiglia di utilizzare cartucce costituite da materiale polimerico, con fase stazionaria polare o di materiale siliceo con fase stazionaria C_{18} o C_8. La quantità di materiale adsorbente dipenderà dal tipo di cartucce utilizzate. La procedura di condizionamento, estrazione ed eluizione viene effettuata sotto vuoto montando la cartuccia su una beuta da vuoto o su un sistema per estrazione liquido-solido disponibile in commercio, secondo le modalità consigliate dal produttore delle cartucce.

5.3 "Vial"

Flaconcini di vetro ("vials") di idonea capacità con tappo a vite e guarnizione in silicone teflonata.

5.4 Bilancia tecnica, risoluzione 0,1 g.

5.5 Bilancia analitica, risoluzione 0,1 mg.

5.6 Normale vetreria di laboratorio

Dopo il lavaggio e prima dell'uso, la vetreria deve essere sciacquata con acqua bidistillata ed asciugata in stufa.

6. Reattivi

6.1 Acetonitrile o metanolo (per HPLC)

6.2 Acqua (per HPLC)

6.3 NaOH 6 M

6.4 HCl 6 M

6.5 Soluzione di 2,4-dinitro-fenilidrazina (DNPH)

Sciogliere 428,7 mg di DNPH al 70% in 100 mL di acetonitrile.

6.6 Tampone citrato 1 M, pH=3

Miscelare 80 mL di una soluzione di acido citrico 1 M con 20 mL di una soluzione di citrato di sodio 1 M e aggiustare il pH con NaOH.

6.7 Soluzioni di composti carbonilici

Sono disponibili in commercio delle soluzioni multicomponente di alcuni composti carbonilici derivatizzati con DNPH. Queste soluzioni, essendo vendute con certificato d'analisi, possono essere utilizzate come riferimenti primari. Le soluzioni di riferimento per la taratura, a concentrazione di circa 0,1-10 mg/L vengono ottenute per diluizioni successive delle soluzioni di riferimento concentrate impiegando come solvente la fase mobile usata nell'analisi HPLC.
Le soluzioni concentrate dei rimanenti composti carbonilici si preparano pesando esattamente una quantità di circa 100 mg in un matraccio tarato (100 mL) e portando a volume con acqua o acetonitrile. Queste soluzioni possono essere conservate a 4°C per un mese. Le soluzioni di riferimento, a concentrazione di circa 0,005-10 mg/L, vengono ottenute per diluizioni successive delle soluzioni concentrate impiegando come solvente acqua e derivatizzate come per il campione. È preferibile che le soluzioni di riferimento siano preparate e derivatizzate giornalmente.

7. Procedimento

7.1 Trattamento preliminare

Se il campione è stato refrigerato, prima dell'estrazione farlo riequilibrare a temperatura ambiente. Controllare l'eventuale presenza di particelle in sospensione ed agitare per consentire una migliore omogeneità.

7.2 Derivatizzazione con DNPH

In una beuta introdurre 50 mL di campione acquoso e aggiungere 2 mL di tampone citrato. Portare il pH a 3 con HCl o NaOH. Aggiungere 3 mL di soluzione di DNPH, chiudere la beuta e riscaldare a 40°C per 1 ora tenendo la soluzione in agitazione.

Condizionare la cartuccia SPE come suggerito dal produttore. Far passare quantitativamente il volume di soluzione dopo averla lasciata raffreddare. Seccare la cartuccia sotto vuoto, o con azoto, ed eluire le aldeidi derivatizzate con 6 mL di acetonitrile. Portare il volume dell'estratto a 2 mL sotto moderato flusso d'azoto. Eseguire l'analisi in HPLC-UV a 360 nm. La separazione di tutti i composti carbonilici di Tab. 1 in un'unica analisi risulta abbastanza problematica a causa della co-eluizione di alcuni di essi. Se necessario si possono utilizzare due colonne in serie per migliorare la separazione dei vari componenti o, alternativamente, si possono effettuare due analisi, la prima ottimizzata alla separazione dei composti con tempi di ritenzione più piccoli, la seconda ottimizzata alla separazione dei composti con tempi di ritenzione più grandi.
La Fig. 1 mostra una tipica separazione di alcuni composti carbonilici con questa procedura.

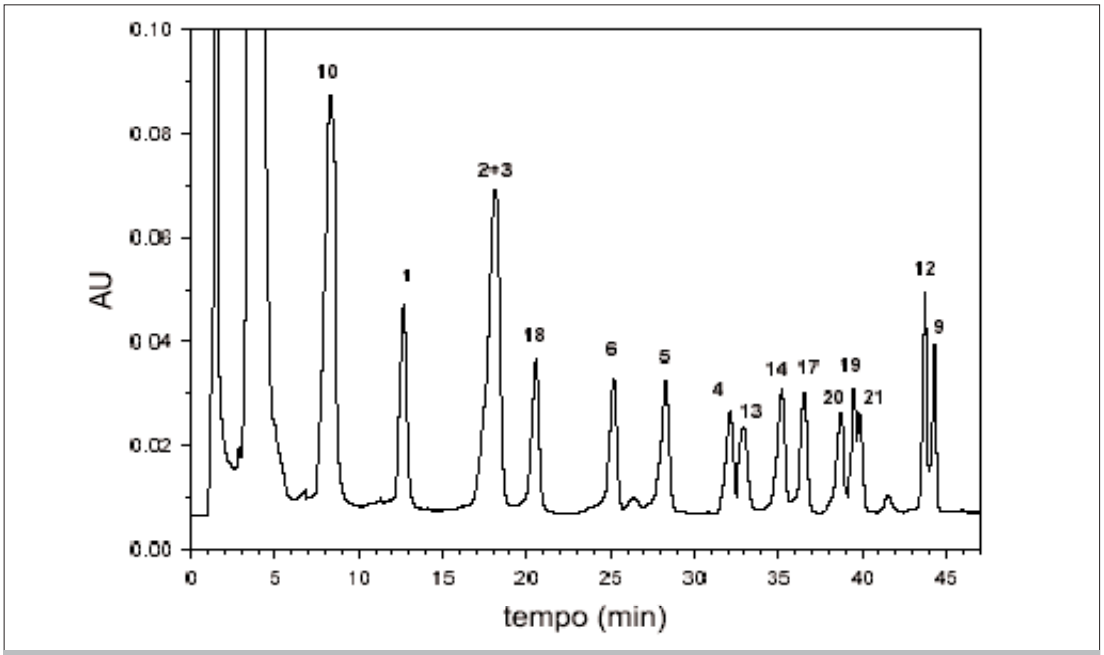


Figura 1: Cromatogramma ottenuto mediante derivatizzazione ed estrazione con cartucce SPE Bondelut C18 da 1 g di un campione di acqua di scarico contaminato con 100-150 ppb di alcuni composti carbonilici di Tab. 1. Condizioni analitiche: colonna cromatografica Supelcosil LC-18 250x3 mm, dimensione particelle 5 µm, volume iniettato 10 µL, flusso 0,7 mL/min, rivelazione 360 nm. Gradiente (acqua/acetonitrile): 60/40 da 0 a 7 min, 40/60 a 40 min, 30/70 a 41 min.

8. Calcoli

Introdurre nel cromatografo liquido volumi uguali di campione e di soluzioni di riferimento. Preparare almeno 3 miscele di composti carbonilici (6.7) ad opportune concentrazioni. Costruire quindi le rette di taratura per i singoli composti, accertandosi di operare nel campo di linearità dello strumento, riportando in grafico l'area del picco del componente (A) in funzione della concentrazione del componente stesso e interpolando i punti sperimentali con il metodo dei minimi quadrati. Ricavare il coefficiente angolare (a) e l'intercetta (b) della retta di taratura. La concentrazione incognita di ogni componente è data dalla relazione:

$$C = \frac{A - b}{a} \cdot \frac{V_f}{V_i}$$

dove:
C = concentrazione (µg/L) di aldeidi;
A = area del picco del composto nella miscela incognita;
b = valore dell'intercetta della retta di taratura;

a = valore del coefficiente angolare della retta di taratura;
V_f = volume (mL) dell'estratto finale;
V_i = volume (mL) del campione acquoso.

9. Qualità del dato

Le iniezioni del campione e delle soluzioni di riferimento vanno ripetute almeno due volte al fine di migliorare l'accuratezza delle misure sperimentali. La ripetibilità dell'analisi viene verificata ripetendo per 10 volte l'analisi di una delle soluzioni di riferimento.
L'impiego di soluzioni multicomponente di alcuni composti carbonilici già derivatizzati ha permesso di stabilire che i recuperi sono superiori all'80% con un coefficiente di variazione del 12%.

Nota: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".*
Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

METODO B2 – Determinazione mediante gascromatografia

1. Principio del metodo

Il metodo si basa su una derivatizzazione dei composti carbonilici nella fase acquosa mediante reazione con O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil)-idrossilammina idrocloruro (PFBHA-HCl) e successiva estrazione liquido-liquido (LLE). I composti carbonilici derivatizzati contenuti nell'estratto organico concentrato vengono separati e rilevati mediante gascromatografia (GC) accoppiata ad un rivelatore a cattura di elettroni (ECD).
L'analisi qualitativa dei singoli composti è basata sul confronto dei tempi di ritenzione dei picchi ottenuti nel cromatogramma del campione con quelli ottenuti da idonee miscele di riferimento. La determinazione quantitativa dei vari composti viene effettuata con le aree dei rispettivi picchi cromatografici sulla base di opportune rette di taratura di miscele di riferimento. I risultati sono di norma espressi in µg/L, per ciascun composto carbonilico.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile alle acque superficiali, sotterranee e di scarico e consente la determinazione dei composti carbonilici riportati in Tab. 1 (vedi Metodo B1).
Per le acque superficiali e di scarico il metodo presenta un limite di rilevabilità, per ciascun composto carbonilico, inferiore a 10 µg/L.

3. Interferenze e cause di errore

Normali interferenti possono essere quei composti organici che danno luogo, durante l'analisi cromatografica, a picchi con tempi di ritenzione coincidenti con quelli dei composti in esame. Solventi, reattivi, vetreria, contaminazione dell'ambiente di lavoro ed ogni trattamento del campione possono causare la presenza di picchi interferenti e/o alterazioni della corrente di fondo del rivelatore con conseguenti difficoltà d'interpretazione del tracciato cromatografico.

Pertanto, al fine di essere sicuri che tutti i materiali utilizzati siano esenti da interferenze nelle condizioni operative adottate è buona norma, sia all'inizio dell'indagine che periodicamente, sottoporre all'intera procedura uno o più "bianchi" sostituendo al campione acqua distillata. Nel caso di evidenza d'interferenze, individuarne la provenienza analizzando ogni singolo passaggio della procedura e procedere alla loro eliminazione. Può essere richiesta una specifica selezione dei reattivi ed una purificazione dei solventi mediante distillazione.
Particolare attenzione deve essere rivolta alla formaldeide in quanto essendo ormai ubiquitario nell'ambiente può contaminare il derivatizzante. Qualora questo venga accertato, si consiglia di utilizzare una nuova confezione di derivatizzante o di purificarlo per cristallizzazione.
Si deve evitare che la vetreria da utilizzare venga in contatto con acetone in quanto questo solvente reagisce con il derivatizzante dando luogo a composti interferenti.

4. Campionamento e conservazione del campione

I campioni vengono prelevati in bottiglie di vetro neutro, possibilmente scuro, con chiusura a smeriglio oppure a vite con guarnizione di teflon. Non filtrare l'acqua ed evitare ogni operazione che faciliti la perdita dei composti organici volatili disciolti. Riempire la bottiglia fino all'orlo e tappare subito evitando di lasciare spazi gassosi nei quali possono passare i componenti più volatili che vanno perduti all'apertura della bottiglia, dando risultati in difetto.
Le analisi devono essere effettuate al più presto e in ogni caso non oltre 48 ore dopo il prelievo del campione, conservando questo in frigorifero a 4°C nel periodo d'attesa.

5. Apparecchiature

5.1 Gascromatografo

Si consiglia l'uso di un gascromatografo dotato di iniettore "splitless" o "on-column", colonna capillare di vetro o silice fusa di media polarità, di opportuna lunghezza e diametro interno, e di rivelatore ECD. Si consiglia l'uso di un elaboratore di dati cromatografici per la misura delle aree dei picchi con possibilità di stampa di dati e cromatogrammi.
L'analisi viene effettuata in "programmata di temperatura" le cui caratteristiche e durata, così come il flusso del gas di trasporto, dipendono dal tipo e dalle dimensioni della colonna utilizzata.

5.2 "Vial"

Flaconcini di vetro ("vials") di idonea capacità con tappo a vite e guarnizione in silicone teflonata.

5.3 *Bilancia tecnica*, risoluzione 0,1 g.

5.4 *Bilancia analitica*, risoluzione 0,1 mg.

5.5 Normale vetreria di laboratorio

Dopo il lavaggio e prima dell'uso, la vetreria deve essere sciacquata con acqua bidistillata ed asciugata in stufa.

6. Reattivi

6.1 O-(2,3,4,5,6-pentafluorobenzil)-idrossilammina idrocloruro (PFBHA-HCl)

Preparare una soluzione 1 g/L in acqua.

6.2 Tiosolfato di sodio ($Na_2S_2O_3$) 0,1 M

6.3 n-Esano puro per analisi

6.4 Acido solforico 0,1 M e 18 M

6.5 Solfato di sodio anidro (Na_2SO_4)

6.6 Elio o idrogeno puri per gas cromatografia usati come gas di trasporto, eventualmente passati attraverso una trappola a carbone attivo e una trappola a setacci molecolari. Un'ulteriore purificazione può essere fatta tramite passaggio in una trappola per l'eliminazione delle tracce d'ossigeno.

6.7 Soluzioni di riferimento di composti carbonilici

6.7.1 Soluzioni concentrate

Le soluzioni concentrate si preparano pesando una quantità di circa 100 mg di ognuno dei composti carbonilici di Tab. 1, trasferendola in un matraccio tarato (100 mL) e portando a volume con acqua o metanolo. Queste soluzioni possono essere conservate a 4°C per un mese.

6.7.2 Soluzioni diluite

Le soluzioni diluite, a concentrazione di circa 0,005-10 mg/L, vengono ottenute per diluizioni successive delle soluzioni di riferimento (6.7.1) impiegando come solvente acqua e derivatizzate come per il campione. È preferibile che dette soluzioni siano preparate e derivatizzate giornalmente.

7. Procedimento

7.1 Trattamento preliminare

Se il campione è stato refrigerato, prima dell'estrazione farlo riequilibrare a temperatura ambiente. Controllare l'eventuale presenza di particelle in sospensione ed agitare per consentire una migliore omogeneità.

7.2 Derivatizzazione con PFBHA-HCl

In una "vial" introdurre 5 mL di campione acquoso, aggiungere 2 gocce di soluzione di tiosolfato 0,1 M e 0,5 mL di soluzione di PFBHA-HCl. Chiudere la beuta e agitare la soluzione per 2 ore. Aggiungere 1 goccia di soluzione di acido solforico 18 M, 1 mL di n-esano e agitare vigorosamente per estrarre i composti carbonilici per 2-3 minuti. Trasferire la fase di esano in un'altra "vial", aggiungere 5 mL di soluzione di acido solforico 0,1 M e agitare vigorosamente per 2-3 minuti. Trasferire la fase di esano in un'altra "vial", anidrificare con solfato di sodio ed eseguire l'analisi in GC-ECD.
La Fig. 2 mostra una tipica separazione di alcuni composti carbonilici con questa procedura.

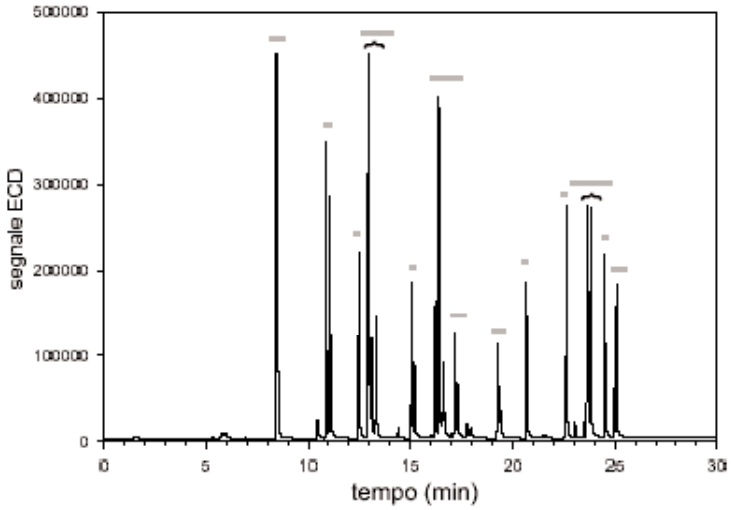


Figura 2: Cromatogramma ottenuto mediante estrazione di un campione di acqua di pozzo contaminato con 50 ppb di alcuni composti carbonilici di Tab. 1. Condizioni analitiche: colonna cromatografica Chrompack CP-Sil 60 m x 0,32 mm, spessore del film 0,25 µm, gas di trasporto idrogeno (40 cm/s), volume iniettato 1 µL. Temperatura del forno: 40°C per 1 min, 6°C/min fino a 150°C, 15°C/min fino a 280°C, isoterma per 5 min.

8. Calcoli

Introdurre nel cromatografo liquido volumi uguali di campione e di soluzioni di riferimento. Preparare almeno 3 miscele di composti carbonilici (6.7.2) ad opportune concentrazioni. Costruire quindi le rette di taratura per i singoli composti, accertandosi di operare nel campo di linearità dello strumento, riportando in grafico l'area del picco del componente (A) in funzione della concentrazione del componente stesso e interpolando i punti sperimentali con il metodo dei minimi quadrati. Ricavare il coefficiente angolare (a) e l'intercetta (b) della retta di taratura. La concentrazione incognita di ogni componente è data dalla relazione:

$$C = \frac{A - b}{a} \cdot \frac{V_f}{V_i}$$

dove:
C = concentrazione (µg/L) di aldeidi;
A = area del picco del composto nella miscela incognita;
b = valore dell'intercetta della retta di taratura;
a = valore del coefficiente angolare della retta di taratura;
V_f = volume (mL) dell'estratto finale;
V_i = volume (mL) del campione acquoso.

9. Qualità del dato

Le iniezioni del campione e delle soluzioni di riferimento vanno ripetute almeno due volte al fine di migliorare l'accuratezza delle misure sperimentali. La ripetibilità dell'analisi viene verificata ripetendo per 10 volte l'analisi di una delle soluzioni di riferimento.

Nota: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su*

materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".
Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

BIBLIOGRAFIA

ALCEON CORPORATION (1993): "*Overview of available information on the toxicity of drinking water disinfectants and their by-products*", Cambridge, MA.

CHORUS I., KLEIN G., FASTNER J. & ROTARD W. (1992): "Off-flavors in surface waters - How efficient is bank filtration for their abatement in drinking water?" *Wat. Sci. Technol.*, **25**, (2), 251-258.

EPA (1992): "*Method 8315, Determination of carbonyl compounds by high performance liquid chromatography*", November 1992, Cincinnati, Ohio, USA.

EPA (1992): "*Method 554, Determination of carbonyl compounds in drinking water by dinitrophenyl-hydrazine derivatization and high performance liquid chromatography*", November 1992, Cincinnati, Ohio, USA.

GLAZE W.H., KOGA M. & CANCILLA D. (1989): "Ozonation by-products. 2. Improvement of an aqueous-phase derivatization method for the detection of formaldehyde and other carbonyl compounds formed by the ozonation of drinking water", *Environ. Sci. Technol.*, **23**, 838-847.

HAUSER T.R. (1965): "*Determination of aliphatic aldehydes: 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone hydrochloryde (MBTH) method. Selected methods for the measurement of air pollutants",* U.S.D.H.E.W., P.H.S.

HAUSER T.R. & CUMMINGS R.L. (1964): "Increasing sensitivity of 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone test for analysis of aliphatic aldehydes in air", *Anal. Chem.,* **36**, 679.

KIEBER R.J. & MOPPER K. (1990): "Determination of picomolar concentrations of carbonyl compounds in natural waters, including seawater, by liquid chromatography", *Environ. Sci. Technol.*, **24**, 1477-1481.

KRASNER S.W., MCGUIRE M.J., JACANGELO J.G., PATANIA N.L., REAGAN K.M. & AIETA E.M. (1989): "The occurrence of disinfection by-products in US drinking water", *J. Am. Wat. Wks. Assoc.*, **81** (8), 41-53.

SAWICKI E., HAUSER T.R., STANLEY T.W. & ELBERT W. (1961): "The 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone test", *Anal.Chem.,* **33**, 93.

SCHEUPEIN R.J. (1985) In: *Advances in Chemistry 210*, V. Turoski (Ed.), American Chemistry Society, Washington, 237-245.

5020. Ammine alifatiche

Il metodo descritto consente la determinazione di mono-, di-, trimetilammina, n-propilammina, acetilammina o ammide dell'acido acetico e cicloesilammina. In generale, la determinazione gascromatografica delle ammine presenta alcuni problemi dovuti alla elevata basicità di questi composti, superiore in qualche caso a quella dell'ammoniaca, con conseguenti problemi di eluizione in colonna.
Alcune ammine presentano inoltre elevata tensione di vapore e temperature di ebollizione inferiori alla temperatura ambiente. L'acidificazione immediata del campione, prima della determinazione mediante gascromatografia liquido-solida (GLSC) con rivelatore specifico (AFD), consente di attenuare le difficoltà insite nella procedura analitica.

1. Principio del metodo

Il metodo si basa sull'estrazione, rispettivamente, con diclorometano e n-esano della componente acida e neutra eventualmente presente nel campione, sulla successiva alcalinizzazione dello stesso e sulla determinazione delle ammine mediante gascromatografia liquido-solido (GLSC) con rivelatore specifico per composti azotati (Alkali Flame Detector, AFD).

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile al di sopra delle seguenti concentrazioni riportate in Tab. 1:

Tabella 1: Campo di applicazione del metodo

Monometilammina	0,2 mg/L
Dimetilammina	0,3 mg/L
Trimetilammina	0,3 mg/L
n-Propilammina	2,5 mg/L
Cicloesilammina	0,3 mg/L
Acetilammina (ammide dell'acido acetico)	2 mg/L

3. Interferenze e cause di errore

Nelle condizioni operative di analisi possono interferire altre ammine con tempi di ritenzione similari. Le interferenze di altri composti azotati e fosforati possono essere eliminate applicando il procedimento di purificazione descritto nel Capitolo 7.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il prelievo e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".
È necessario acidificare il campione, immediatamente dopo il prelievo, con una soluzione di acido cloridrico (6.4) fino a pH 1 (±10%).

5. Apparecchiature

5.1 Normale vetreria di laboratorio

La vetreria deve essere accuratamente lavata e risciacquata con acqua bidistillata ed asciugata in stufa con circolazione di aria a 50°C.

5.2 Matracci da 100 mL e 250 mL

5.3 Cilindri graduati da 100 mL

5.4 Bilancia analitica con risoluzione di 0,1 mg.

5.5 Vetrini da orologio ed imbuti

5.6 Microsiringhe da 10 µL, 25 µL, 50 µL, 100 µL

5.7 Imbuti separatori da 150 mL, 250 mL

5.8 Pipette graduate da 1 mL, 5 mL, 10 mL

5.9 Pipette Pasteur

5.10 pHmetro

5.11 Microsiringa da 5 µL per iniezione del campione e delle soluzioni di taratura.

5.12 Gascromatografo per colonne impaccate con rivelatore per composti azotati e fosforati (Alkali Flame Detector, AFD)

5.13 Sistema di registrazione e di calcolo delle aree dei picchi

5.14 Colonna impaccata in vetro (L=1,80 m; d.i.=2 mm) con 4% Carbowax 20 M+0,8% di KOH su Carbopack B 80/100 mesh (vedi nota 2)

5.15 Elio, idrogeno, ed Aria ultrapura (UPP) ulteriormente purificati con gel di silice e setacci molecolari.

6. Reattivi

Tutti i reattivi devono avere un grado di purezza analitica tale che una prova in bianco non dia interferenze.

6.1 *Acqua bidistillata*

6.2 Soluzione di riferimento di ammine (grado di purezza superiore al 98%)

Per la mono-, di- e trimetilammina è necessario utilizzare il relativo cloridrato data la loro bassa temperatura di ebollizione come ammine libere.

6.3 Soluzioni di riferimento concentrate di ammine (300 ng/µL)

Pesare, rispettivamente, 166 mg, 121 mg e 123 mg dei cloridrati della mono-, di- e trimetilammina. Trasferire quantitativamente ogni ammina in un matraccio da 250 mL e portare a volume con acqua bidistillata.

Pesare 76 mg di acetilammina, trasferire quantitativamente in un matraccio da 250 mL e portare a volume con acqua bidistillata.
Prelevare, rispettivamente, 88 µL e 107 µL di cicloesilammina e n-propilammina, trasferirle in un matraccio da 250 mL contenente 100 mL di acqua bidistillata, aggiungere 3-4 gocce di HCl (6.4) e portare a volume con acqua.
Per diluizioni successive delle soluzioni concentrate si preparano almeno 4 soluzioni miste di taratura all'interno del campo di indagine analitico.

6.4 Acido cloridrico 1:4

Aggiungere 1 volume di acido cloridrico di elevata purezza al 37% a 4 volumi di acqua bidistillata.

6.5 Diclorometano per HPLC

6.6 n-Esano per HPLC

6.7 Sodio idrossido solido, reattivo puro per analisi.

7. Procedimento

In un imbuto separatore estrarre 100 mL di campione, precedentemente acidificati con HCl (6.4) a pH=1 (il valore di pH 1 non è critico per cui oscillazioni del 10% non inficiano i risultati dei recuperi durante la procedura di estrazione del campione con i due solventi 6.5 e 6.6), per tre volte con 30 mL di diclorometano (6.5) e per tre volte con n-esano (6.6). Scartare gli estratti organici e alla soluzione acquosa aggiungere 1-2 pasticche di NaOH solido (6.7) per raggiungere il valore di pH=13.
Data l'elevata volatilità di alcune ammine, è necessario procedere all'analisi gascromatografica del campione immediatamente dopo l'alcalinizzazione. L'analisi viene effettuata iniettando 1 µL della soluzione acquosa direttamente in colonna. Al Paragrafo 7.1 si descrivono a titolo esemplificativo, le condizioni operative tipiche dell'analisi gascromatografica e in Fig. 1 si riporta un esempio di cromatogramma di un campione di acqua di scarico.

7.1 Condizioni gascromatografiche

Temperatura del forno:

- Isoterma iniziale a 75°C per 0,5 minuti
- Gradiente di temperatura di 30°C/minuto fino a 190°C;
- Isoterma finale a 190°C per 15 minuti o fino a completa eluizione dei composti contenuti nel campione.

Rivelatore per composti azotati e fosforati (AFD):

- Temperatura 280°C (le altre condizioni operative del rivelatore vanno ottimizzate al fine di ottenere la massima sensibilità);
- Idrogeno al flusso di 3 mL/minuto
- Aria al flusso di 50 mL/minuto;
- Tensione applicata: 19 volt.

Temperatura iniettore: 250°C

Gas di trasporto: elio al flusso di 35 mL/minuto.

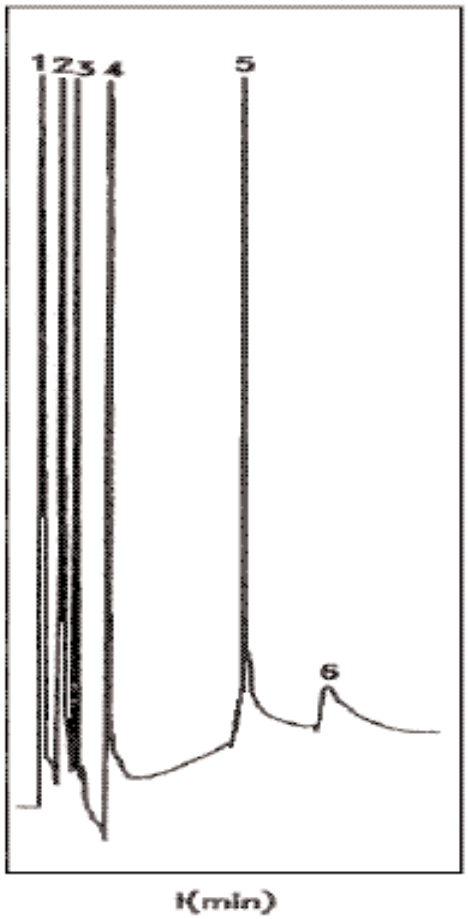


Figura 1: Cromatogramma di un'acqua di scarico addizionata con una miscela di ammine (3 ng/µL). 1=monometilammina; 2=dimetilammina; 3=trimetilammina; 4=n-propilammina; 5=cicloesilammina; 6=acetilammina.

8. Calcoli

La concentrazione di ogni ammina viene determinata confrontando l'area del picco cromatografico relativo a ciascuna ammina nel campione con quella dell'analogo picco nella soluzione di riferimento e apportando le correzioni relative al recupero (R%) e alla diluizione del campione per l'aggiunta della soluzione di acido cloridrico (6.4).
La formula da applicare è la seguente:

$$C = \frac{A_c C_s (V_c + V_a)}{A_s R V_c}$$

dove:
C = concentrazione (mg/L) di ammina;
A_c = area del picco dell'ammina nel campione;
A_s = area del picco dell'ammina nella soluzione di riferimento;
C_s = concentrazione (mg/L) dell'ammina nella soluzione di riferimento;
V_c = volume (mL) di campione prelevato;
V_a = volume (mL) di soluzione di HCl (6.4) aggiunto;
R = recupero (%) calcolato con almeno 5 determinazioni.

9. Qualità del dato

Effettuando cinque prove su 100 mL di acqua di scarico (priva delle ammine da determinare), cui sono state aggiunte quantità note di ogni ammina in modo da realizzare concentrazioni di 0,5 mg/L, 1 mg/L, 2,5 mg/L e 5 mg/L si sono ottenuti valori del coefficiente di variazione, [CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100], compresi tra il 2% e il 6% e recuperi compresi tra il 93% e il 97%.

Nota 1: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico". Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.*

Nota 2: *la preparazione e l'utilizzo della colonna gascromatografica (5.14) richiede molta attenzione in quanto il Carbopack B è particolarmente frantumabile per cui è necessario operare delicatamente durante la sua preparazione. Inoltre, dopo aver condizionato la colonna per 24 ore a 220°C, occorre iniettare 10 µL di H_2O bidistillata per almeno 30 volte. Quest'ultima operazione va ripetuta ogni volta che i picchi delle ammine non siano opportunamente separati tra loro e soprattutto se risultano scodati. È opportuno, infine, iniettare, ogni 4-5 campioni analizzati, 1 µL di acqua bidistillata per verificare l'effetto "memoria" della colonna.*

BIBLIOGRAFIA

ALIDUL-RASHID M.K. et al. (1991): " Determination of volatile amines in sediment and water samples", *Anal. Chim. Acta*, **252**, (1-2) 229-236.

GREENHERG L. et al. (1992): "Determination of aliphatic amines in air by membrane enrichment directly coupled to a gas chromatograph", *Chromatographye*, **33**, (1-2), 72-82.

GREENHERG L. et al. (1992): "Measurement of aliphatic amines in ambient air and rainwater", *Chemosphere*, **24**, (10), 1533-1540.

KATOOKE H. et al. (1992): "Determination of low molecular weight aliphatic primary amines in urine as their benzene-sulfonyl derivates by chromatography with flame photometric detection", *Biomed. Chromatogr.* **6**, (5), 72-82.

YANG X.H. et al. (1993): "Determination of nanomolar concentrations of individual dissolved low molecular weight amines and organic acids in sea water", *Anal. Chem.*, **65**, (5), 572-576.

ZHANG A.Q. et al. (1992): "Determination of trimethylamine and relate aliphatic amines in human urine by head-space gas chromatography", J. *Chromatogr. Biomed. Appl.,* **584**, (2), 141-145.

5030. Azoto organico

Per azoto organico s'intende l'azoto presente in diversi composti organici (ammine, ammidi, immine, ecc.) incluso l'azoto albuminoideo. La sua presenza nelle acque è dovuta principalmente a sostanze di origine animale e vegetale, quali amminoacidi, polipeptidi e proteine.
L'azoto organico può essere determinato per digestione del campione, dopo rimozione dell'ammoniaca libera, distillando l'ammoniaca formatasi nella digestione stessa e titolandola con una soluzione di riferimento di un acido minerale forte o dosandola per via spettrofotometrica. Nel caso non si ricorra alla preventiva rimozione dell'ammoniaca libera, si ottiene la misura del tradizionale azoto Kjeldahl.
Con il presente metodo non si determinano nitrati e nitriti. Inoltre, il metodo non determina l'azoto presente in azidi, azine, azocomposti, idrazoni, nitrili, nitro e nitroso composti, ossime e semicarbazoni per la cui determinazione è richiesto un trattamento del campione mediante digestione-ossidazione al persolfato.

1. Principio del metodo

L'azoto organico viene trasformato in solfato monoidrogeno di ammonio attraverso un processo di mineralizzazione, realizzato per digestione del campione con H_2SO_4 concentrato, previa aggiunta di solfato di rame, come catalizzatore, e di solfato di potassio per raggiungere un punto di ebollizione di 345°-370°C. La temperatura non deve superare i 382°C per evitare perdite di azoto.
Dopo raffreddamento e diluizione con acqua distillata esente da ammoniaca, il campione acido viene portato ad un pH alcalino per aggiunta di idrossido di sodio, quindi si distilla raccogliendo il distillato tal quale per la determinazione dell'ammoniaca con il reattivo di Nessler, oppure raccogliendo il distillato in una soluzione di acido borico per il dosaggio titrimetrico. In questo ultimo caso, il borato di ammonio viene titolato con una soluzione di riferimento di acido solforico in presenza di un indicatore misto.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile nell'intervallo 1-100 mg/L.

3. Interferenze e cause di errore

Il nitrato, in concentrazioni superiori a 10 mg/L, interferisce negativamente in quanto può ossidare ad N_2O una parte dell'ammoniaca prodotta nel processo di digestione.
Interferenze positive sono causate dalla presenza di elevate concentrazioni di composti organici riducenti, che possono ridurre il nitrato ad ammoniaca.
In presenza di elevate quantità di sostanze organiche non azotate, che consumano acido solforico per la loro ossidazione a CO_2 ed H_2O, è necessario aggiungere altri 50 mL della soluzione acida (6.3) per ogni grammo di COD presente nel campione in esame, in modo tale da mantenere un rapporto ottimale tra acido e sali della miscela ossidante ed impedire un innalzamento della temperatura di digestione al di sopra di 380°C. In tal caso può risultare necessario aggiungere un volume maggiore della soluzione alcalina (6.5) per avere un pH nettamente basico (pH>11), come richiesto dalla procedura di distillazione.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il prelievo e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".
Poiché l'azoto organico nei campioni di acqua di scarico non sterili viene trasformato in ammoniaca, è necessario eseguire il dosaggio su campioni prelevati di fresco. Se l'analisi non può essere effettuata entro le 24 ore dal prelievo, il campione deve essere filtrato su filtro da 0,45 µm e conservato a 4°C, previa aggiunta di 1 mL di acido solforico concentrato su 1 L di campione.

5. Apparecchiature

5.1 Apparecchio di digestione comprendente un pallone di Kjeldahl a collo lungo di vetro Pyrex della capacità di 500/1000 mL.

5.2 Apparecchio di distillazione per la determinazione dell'azoto ammoniacale.

5.3 Spettrofotometro, dotato di celle con cammino ottico da 1 cm.

6. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere di grado analitico. L'acqua utilizzata nella preparazione dei reattivi deve essere deionizzata ad elevato grado di purezza.

6.1 Soluzione tampone di borato

Sciogliere 9,5 g di $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ in 500 mL di acqua, aggiungere 88 mL di NaOH 0,1 N e diluire a 1 L.

6.2 Acido solforico concentrato H_2SO_4 (d=1,84)

6.3 Soluzione di acido solforico-solfato di rame-solfato di potassio

Sciogliere 134 g di K_2SO_4 e 7,3 g di $CuSO_4$ in circa 800 mL di acqua, aggiungere cautamente 134 mL di acido solforico concentrato. Raffreddare la soluzione e diluirla a 1 litro. La soluzione va mantenuta a 20°C per impedirne la cristallizzazione.

6.4 Soluzione di idrossido di sodio (NaOH) 6 M

6.5 Soluzione di idrossido di sodio-tiosolfato di sodio

Sciogliere 500 g di idrossido di sodio (NaOH) e 25 g di tiosolfato di sodio($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) in acqua e diluire a 1 litro.

6.6 Indicatore misto

Mescolare 2 volumi di una soluzione allo 0,2% di rosso di metile in alcool etilico al 95% con 1 volume di soluzione allo 0,2% di blu di metilene in alcool etilico al 95%. La soluzione, conservata a 4°C, è stabile per circa 1 mese.

6.7 Soluzione di acido borico con indicatore

Sciogliere 20 g di acido borico (H_3BO_3) in acqua, aggiungere 10 mL di soluzione di indicatore misto e diluire a 1 L con acqua. Questa soluzione è stabile per circa un mese, se conservata a 4°C.

6.8 Soluzione di riferimento di acido solforico (H_2SO_4) 0,02 N

6.9 Reattivo di Nessler

7. Procedimento

Introdurre nel pallone Kjeldahl un volume noto del campione di acqua da esaminare. Il quantitativo di campione da impiegare può essere dedotto dalla seguente Tab. 1.

Tabella 1: Relazione tra concentrazione N org e volume campione

Contenuto di N organico nell'acqua (mg/L)	Volume di campione (mL)
0-1	500
1-10	250
10-20	100
20-50	50
50-100	25

Diluire, se necessario, il campione a 300 mL e neutralizzare a pH=7. Se il campione contiene cloro residuo aggiungere un volume opportuno di soluzione di tiosolfato di sodio (3,5 g/L di $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$): 1 mL di questa soluzione rimuove 1 mg/L di cloro residuo in 500 mL di campione. Aggiungere 25 mL di soluzione tampone di borato (6.1) e NaOH 6 N (6.4) fino a pH=9,5. Distillare l'ammoniaca libera finchè il distillato non dia più reazione positiva con il reattivo di Nessler.
La soluzione rimasta dalla distillazione dell'ammoniaca viene utilizzata per la determinazione dell'azoto organico. Aggiungere 50 mL del reattivo (6.3). Se il campione in esame contiene elevate quantità di sostanze organiche non azotate, aggiungere altri 50 mL di reattivo (6.3) per ogni grammo di COD contenuto nel campione.
Effettuare la digestione, facendo bollire la soluzione fino a che non diventa chiara e poi per altri 20-30 minuti. Lasciar raffreddare la soluzione ed aggiungere 300 mL di acqua distillata esente da ammoniaca. Connettere il pallone Kjeldahl all'apparecchio di distillazione immediatamente prima dell'aggiunta di 50 mL del reattivo (6.5); in tal modo si evitano perdite di ammoniaca, rilasciata a seguito del riscaldamento della soluzione conseguente al mescolamento. Il pH della soluzione dovrebbe essere maggiore di 11.
Distillare fin quando il distillato non dia più reazione con il reattivo di Nessler. Poiché i reattivi utilizzati possono contenere tracce di ammoniaca, sottoporre un bianco (acqua deionizzata) all'intera procedura analitica.
L'ammoniaca distillata può essere determinata:

a) con il metodo di Nessler, previa preparazione di una curva di taratura (vedi Sezione 4030 "Azoto ammoniale" Metodo A2);
b) per titolazione mediante una soluzione di riferimento di H_2SO_4 0,02 N, impiegando l'indicatore rossometile-blu di metilene.

Nel caso in cui si utilizzi il metodo per titolazione, raccogliere il distillato in 50 mL di soluzione di acido borico contenente l'indicatore misto (6.7). Durante l'operazione di distillazione, l'estremità inferiore del refrigerante deve essere costantemente immersa nella soluzione di acido borico e la temperatura del refrigerante non deve superare i 29°C.

8. Calcoli

Il contenuto di azoto organico si ottiene dalla formula:

$$C = \frac{(a-b)}{V} N \cdot 14 \cdot 1000$$

dove:
C = concentrazione (mg/L) di N organico;
a = volume (mL) di H_2SO_4 0,02 N impiegato per il campione;
b = volume (mL) di H_2SO_4 0,02 N impiegato per il bianco;
V = volume (mL) di campione di acqua utilizzato;
N = normalità dell'H_2SO_4 titolante;
14 = peso equivalente dell'azoto.

9. Qualità del dato

Determinazioni eseguite (n=5) alla concentrazione di 3 mg/L di azoto hanno fornito un coefficiente di variazione, [CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100], pari all'1%. I valori di recupero sono risultati pari al 98% nell'intervallo 1-5 mg/L e del 99% nell'intervallo 5-50 mg/L. Per valutare l'accuratezza della procedura di digestione è consigliabile effettuare prove di recupero utilizzando soluzioni a concentrazione nota di acido nicotinico (verifica della completezza della procedura di digestione) e di cloruro di ammonio (verifica di eventuali perdite di azoto).

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed. (Washington, APHA).

5040. Carbonio organico disciolto

Introduzione

Il carbonio può essere presente nelle acque sotto forma di specie inorganiche (carbonati, bicarbonati e anidride carbonica) e di composti organici che si distribuiscono tra fase disciolta e sospesa (Tab. 1). Il carbonio complessivo risultante dalla somma del carbonio inorganico (TIC) e di quello organico (TOC) presente nelle due fasi costituisce il carbonio totale (TC). Il carbonio organico disciolto (DOC) rappresenta la frazione organica di carbonio che passa attraverso una membrana filtrante da ~ 1 μm, mentre il carbonio organico sospeso o particolato (POC) rappresenta la frazione trattenuta dalla membrana. La somma di queste due frazioni dà il carbonio organico totale (TOC).
La determinazione della sostanza organica nelle acque è stata spesso effettuata, in attività di monitoraggio di corpi idrici e di controllo di qualità degli effluenti, facendo ricorso a parametri di tipo aspecifico quali la richiesta chimica di ossigeno (COD) e la richiesta biologica di ossigeno (BOD). La diffusione di questo tipo di misure, che fa riferimento all'effetto prodotto dal carico organico sul bilancio di ossigeno del sistema, è stata favorita dalla semplicità e dal basso costo delle apparecchiature richieste. Tuttavia, la necessità di avere in tempi rapidi risposte sul contenuto di sostanza organica, l'opportunità di ridurre la produzione di rifiuti tossici derivanti dall'attività analitica (Hg, Ag e Cr(VI) nel caso del COD; sodioazide per il BOD) e l'interesse scientifico ad avere informazioni puntuali sul carbonio organico hanno determinato un crescente interesse per determinazioni di tipo strumentale rivolte direttamente alla misura del carbonio.

Tabella 1: Acronimi utilizzati per indicare le diverse specie di carbonio presenti nelle acque

Carbonio inorganico totale	TIC
Carbonio organico totale	TOC = DOC + POC
Carbonio totale	TC = TIC + TOC
Carbonio inorganico disciolto	DIC
Carbonio organico disciolto	DOC
Carbonio totale disciolto	DC = DIC + DOC
Carbonio organico particolato	POC

La determinazione del carbonio come indice di sostanza organica è, tra l'altro, indipendente dallo stato di ossidazione di quest'ultima ed inoltre non comprende specie inorganiche che invece possono contribuire alla richiesta di ossigeno espressa dal BOD e dal COD. Il TOC, o meglio il DOC e il POC assumono notevole importanza nelle acque di mare, in quanto rappresentano l'unica via praticabile per determinare il contenuto di carbonio organico in matrici saline. Il BOD e il COD, infatti, a causa dell'interferenza dei cloruri (presenti in elevate concentrazioni) e dei bassi contenuti di sostanza organica, non possono essere utilizzati in acqua di mare.
Il problema chiave da affrontare per una corretta determinazione del carbonio organico è quello del bianco. In analisi strumentali di questo tipo il bianco risulta da due diversi contributi, quello dell'acqua ultrapura utilizzata per la taratura dello strumento e quello strumentale connesso con il tipo di apparecchiatura e, in particolare, di catalizzatore impiegato. Solo il secondo contributo è effettivamente da sottrarre alle misure sperimentali, ma in pratica è molto difficile distinguere i due contributi, per cui si finisce con il sottrarre il bianco complessivo; è ovvio quindi, che le misure potranno essere accurate solo nel caso in cui il bianco dell'acqua sia trascurabile rispetto a quello strumentale.
La delicatezza nell'esecuzione delle misure del bianco si manifesta soprattutto qualora si operi in acque marine ove i livelli di DOC sono in genere nell'intervallo 100-200 μM. In altre matrici ove le concentrazioni di carbonio organico sono maggiori le incertezze sul bianco influenzano in misura minore l'accuratezza delle misure.

Il TOC è inserito tra i parametri indicatori nel D.Lgs. 31/2001 concernente le caratteristiche di qualità delle acque destinate al consumo umano, in quanto le sostanze organiche contenute in un'acqua possono reagire con i reattivi utilizzati nei processi di disinfezione e dar luogo a composti potenzialmente tossici o cancerogeni.
In un'acqua potabile i valori tipici di carbonio organico sono in genere inferiori a 1 mg/L mentre nelle acque di scarico si riscontrano livelli molto elevati di composti organici (>100 mg/L).

1. Principio del metodo

Il carbonio organico viene determinato mediante ossidazione catalitica ad alta temperatura (HTO) di una idonea quantità di campione. Il catalizzatore impiegato è costituito da platino supportato su una matrice inorganica (es. allumina, quarzo). Il campione di acqua viene, se necessario, diluito e ben omogeneizzato, quindi iniettato manualmente o mediante autocampionatore in corrente di ossigeno o di aria purificata nel tubo di combustione dove l'acqua viene vaporizzata e il carbonio organico ossidato a CO_2 e H_2O. La CO_2 gassosa viene determinata all'uscita del tubo mediante un rivelatore all'infrarosso.
Il metodo consente di impiegare un microcampione di acqua (50-200 μL) e di eseguire il dosaggio con rapidità e possibilità di automazione.
Dalla misura dell'area del picco di assorbimento IR della CO_2 prodotta, corretta del contributo del bianco, si ricava la concentrazione del carbonio organico o totale (vedi Capitolo 3 per interferenze da CO_2 inorganica) mediante confronto con una curva di taratura ottenuta con soluzioni a concentrazione nota comprese nel campo di indagine analitico.

2. Campo di applicazione

Il metodo è in grado di determinare le concentrazioni comunemente riscontrate in diverse matrici acquose (acque di scarico, superficiali e di mare). L'intervallo di concentrazioni misurabile è variabile in funzione delle condizioni sperimentali (tipo di apparecchiatura impiegata, aliquota di campione dosata).

3. Interferenze e cause di errore

Le operazioni di omogeneizzazione del campione, soprattutto in presenza di un innalzamento della temperatura, possono determinare una perdita di sostanze organiche volatili. L'eliminazione del carbonio inorganico mediante acidificazione e allontanamento della CO_2 con un gas inerte può provocare un'ulteriore perdita di sostanze organiche volatili. In questo caso la misura del carbonio organico si riferisce alla sola frazione non volatile ("not purgeable organic carbon", NPOC). Si può comunque notare che in molte acque superficiali e sotterranee la frazione volatile fornisce un contributo trascurabile al carbonio organico totale. Nel caso in cui si voglia tenere conto anche della frazione volatile si procede alla misura separata del carbonio totale e del carbonio inorganico, ricavando, poi, per differenza il carbonio organico totale (DOC). Il carbonio totale viene determinato iniettando il campione nel tubo di ossidazione senza procedere alla preventiva acidificazione del campione e all'allontanamento della CO_2 prodotta, mentre il solo carbonio inorganico viene dosato (quando lo strumento lo consenta) introducendo il campione in un recipiente di reazione dove viene fatto reagire con un acido (HCl) a temperatura ambiente. In questo modo, solo i carbonati e bicarbonati convertiti in CO_2 e la CO_2 disciolta raggiungono il rivelatore.
Si desidera sottolineare la delicatezza dell'interferenza da CO_2 inorganica. Nelle acque naturali, infatti, il carbonio inorganico è superiore di un fattore 20 circa rispetto all'organico, per cui anche piccole tracce residuali di inorganico dell'ordine dell'1% comporteranno un errore significativo nella determinazione del carbonio organico.
La filtrazione del campione, operazione necessaria per eliminare il materiale sospeso, può

comportare un aumento o una diminuzione del DOC, in funzione delle proprietà fisiche dei composti del carbonio e dell'eventuale adsorbimento o desorbimento di materiale carbonioso. È opportuno valutare il contributo al DOC dovuto al filtro analizzando un bianco di filtrazione.
Eventuali contaminazioni derivanti dai reattivi, dalla vetreria, dai materiali plastici utilizzati possono essere verificate mediante l'effettuazione di bianchi procedurali.

4. Campionamento e conservazione del campione

Conservare i campioni di acqua in bottiglie di vetro scuro, dotate di tappi con guarnizioni in teflon o in contenitori di polietilene ad alta densità. Nel primo caso le bottiglie vanno lavate con acido diluito (HCl 1 M) e trattate in muffola a 550°C per 3-4 ore. Per i tappi è sufficiente un lavaggio accurato in acqua. Nel secondo caso è consigliabile una procedura di decontaminazione mediante trattamento con HNO_3 1,5 M in stufa a 50°C per un'ora, seguito da risciacqui abbondanti con acqua ultrapura. Contenitori di altro materiale plastico possono essere utilizzati dopo aver attentamente verificato che non rilascino sostanze contenenti carbonio.
Procedure di pulizia meno rigorose sono consentite se le concentrazioni di carbonio organico da determinare sono relativamente alte.
Per la determinazione del carbonio organico disciolto (DOC) i campioni di acqua vengono filtrati immediatamente dopo il prelievo su filtri in fibra di vetro precombusti in muffola a 480°C per quattro ore. Per la filtrazione di piccoli volumi (fino a 100 mL) si possono utilizzare filtri montati su un sistema filtrante costituito da una siringa in PVC con portafiltri in policarbonato, un dispositivo che limita le possibilità di contaminazione del campione. Per la filtrazione di volumi più elevati (1-2 litri) si può ricorrere ad un sistema filtrante in vetro borosilicato, preliminarmente trattato in muffola, collegato ad una pompa da vuoto per facilitare la filtrazione. Tra il prelievo del campione e l'analisi deve intercorrere il minor tempo possibile. I campioni debbono essere conservati a bassa temperatura, al riparo della luce e dell'aria, onde prevenire fenomeni di decomposizione batterica e di ossidazione così come fenomeni di produzione di sostanze organiche da attività fitoplanctonica. Nel caso in cui non sia possibile analizzare immediatamente il campione si consiglia di congelarlo a –20°C.

5. Apparecchiature

5.1 Normale attrezzatura da laboratorio

Tutta la vetreria e i contenitori di materiale plastico dovranno essere preventivamente trattati secondo le modalità indicate al Capitolo 4.

5.2 Miscelatore a sbattimento o omogeneizzatore

5.3 Agitatore magnetico dotato di ancorette in teflon.

5.4 Microsiringhe per iniettare volumi fino a 1000 µL.

5.5 Analizzatore di carbonio organico totale

Utilizza la tecnica della combustione ed è dotato di un sistema di rivelazione all'infrarosso non dispersivo (Fig. 1). In alternativa, esistono in commercio strumenti dotati di rivelatori a ionizzazione di fiamma in grado di determinare il metano prodotto dalla reazione di conversione della CO_2.

5.6 pHmetro, completo di elettrodo indicatore e di riferimento.

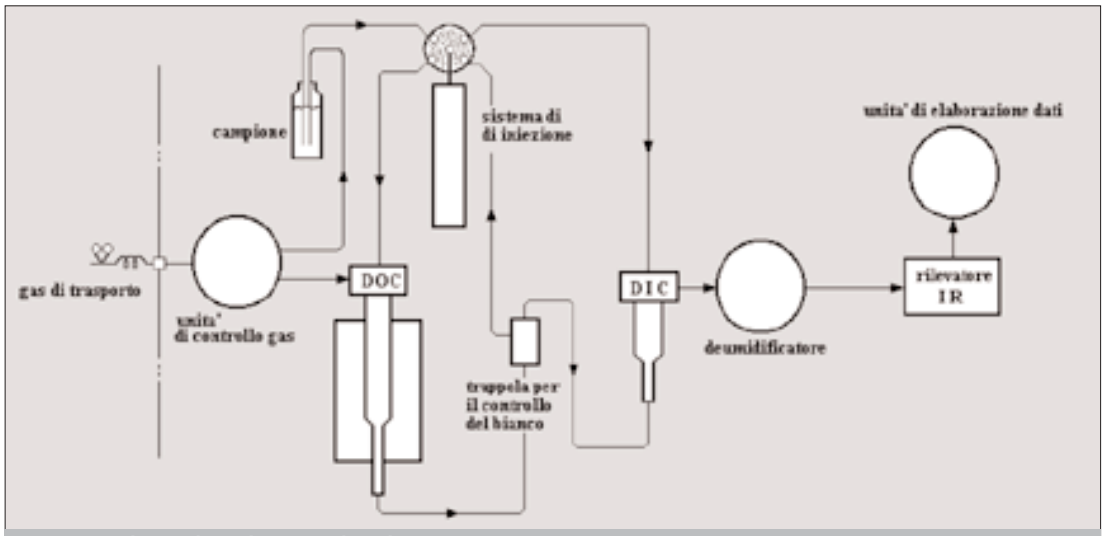


Figura 1: Schema di analizzatore di carbonio organico.

6. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere di grado ultrapuro per analisi in tracce.

6.1 Acqua ultrapura

Utilizzare l'acqua, esente da CO_2, per la preparazione dei bianchi, delle soluzioni di riferimento e per il risciacquo finale della vetreria, avendo cura di evitare al massimo il contatto con l'aria.

6.2 Acido cloridrico concentrato HCl (d=1,19)

6.3 Soluzione di riferimento concentrata contenente 1000 mg/L di carbonio organico

Sciogliere 0,2125 g di ftalato acido di potassio ($C_8H_5KO_4$) in acqua (6.1) e portare a volume in matraccio tarato da 100 mL. Acidificare con HCl (6.2) fino a pH=2 e conservare in recipiente ben chiuso, al buio e a 4°C. La soluzione è stabile per circa due mesi.

6.4 Soluzione di riferimento concentrata contenente 1000 mg/L di carbonio inorganico

Sciogliere 0,3497 g di idrogeno carbonato di sodio, $NaHCO_3$, e 0,4418 g di carbonato di sodio anidro, Na_2CO_3, in acqua (6.1) e portare a volume in matraccio tarato da 100 mL. Conservare la soluzione in un recipiente ben chiuso.

6.5 Materiale per il riempimento dei tubi per lo sviluppo di CO_2

Il materiale e le modalità di riempimento devono essere quelli consigliati dalla ditta costruttrice dell'apparecchio analizzatore (5.5).

6.6 Aria ultrapura, esente da CO_2 e idrocarburi.

Il controllo della linea di base strumentale consente di verificare la purezza dell'aria.

7. Procedimento

Le differenze tra le varie apparecchiature (5.5) disponibili non consentono una codificazione dettagliata di istruzioni adatte ad ogni tipo di strumento. Quindi, per l'attivazione e la predisposizione dell'apparecchio al funzionamento attenersi alle indicazioni riportate nel manuale dello strumento che indica, di norma, anche le condizioni più appropriate per l'esecuzione delle analisi.
Il volume di campione da iniettare nel tubo di combustione è variabile a seconda della capacità del tubo stesso e della quantità di carbonio da dosare.
Il campione viene iniettato quando l'apparecchio è già stato portato a regime per quello che riguarda il flusso di aria, la temperatura dei tubi di combustione, la parte elettronica, ecc.

7.1 Taratura

Costruire la curva di taratura all'inizio di ogni ciclo analitico utilizzando soluzioni di riferimento in numero sufficiente a garantire una corretta interpolazione delle concentrazioni misurate. Le concentrazioni delle soluzioni di riferimento saranno scelte all'interno del campo di linearità dello strumento, nell'intervallo di valori atteso per i campioni.
Verificare ad intervalli regolari la validità della curva di taratura inserendo, in una serie di campioni, l'analisi di un bianco e di una soluzione di riferimento.

7.1.1 Carbonio totale e organico

Per la preparazione delle soluzioni di riferimento per la taratura, diluire opportunamente con acqua (6.1) la soluzione di riferimento concentrata (6.3). Iniettare a turno un'aliquota delle soluzioni preparate nel tubo di combustione e registrare l'area del picco di assorbimento IR della CO_2 prodotta. Effettuare almeno tre repliche per ogni soluzione da analizzare. Costruire la curva di taratura riportando in ascissa le concentrazioni di carbonio organico in mg/L e in ordinata le aree dei picchi corrette del valore ottenuto da un bianco di acqua (6.1) sottoposto alla stessa procedura delle soluzioni di riferimento.
La curva di taratura può essere ottenuta direttamente se si dispone di un sistema di elaborazione dati collegato all'apparecchio analizzatore.

7.1.2 Carbonio inorganico

Per la preparazione delle soluzioni di riferimento per la taratura, diluire opportunamente con acqua (6.1) la soluzione di riferimento concentrata (6.4). Iniettare a turno un'aliquota delle soluzioni preparate nel recipiente di reazione per il carbonio inorganico nel caso di uso di strumenti che prevedono questa possibilità; la CO_2 prodotta viene trasferita dal gas di trasporto al rivelatore IR ed ivi misurata. Effettuare, anche in questo caso, almeno tre repliche per ogni soluzione da analizzare. Per la costruzione della curva di taratura procedere come descritto nel Sottoparagrafo 7.1.1.

7.2 Dosaggio del campione

Se il campione contiene sostanze oleose in superficie e/o sostanze colloidali, dibattere per 10 minuti nell'apposito miscelatore (5.1) circa 250 mL di campione in modo da favorirne la dispersione. Per campioni che presentano tenori elevati di acidi, basi e sali è opportuno procedere ad una preventiva diluizione del campione per migliorare la precisione delle misure ed evitare un rapido deterioramento del catalizzatore e la corrosione di parti strumentali.
Iniettare il campione nel tubo di combustione adottando le stesse condizioni operative utilizzate per la curva di taratura. Ripetere le iniezioni più volte fino ad avere una ripetibilità su tre letture consecutive entro il ±2%.
Per ricavare dal carbonio totale la concentrazione del carbonio organico (DOC), il carbonio inorganico deve essere determinato separatamente o allontanato mediante acidificazione del campione sotto flusso di gas inerte. La misura del carbonio inorganico, quando lo strumento

lo consenta, viene effettuata seguendo le modalità indicate al Sottoparagrafo 7.1.2 per la costruzione della relativa curva di taratura. La determinazione del carbonio organico può essere effettuata soltanto nel caso in cui le frazioni organica ed inorganica siano confrontabili. Nel caso di differenze marcate (ad esempio qualora la frazione organica sia molto piccola), c'è il rischio che le incertezze associate alle misure del carbonio totale e della frazione inorganica producano errori elevati sulla stima per differenza.
Se, invece, si ricorre all'eliminazione del carbonio inorganico prima dell'analisi, trasferire un'aliquota di campione rappresentativa (20-50 mL) in un recipiente e aggiungere acido cloridrico concentrato (6.2) per avere un pH inferiore a 2. In queste condizioni, i carbonati e i bicarbonati vengono trasformati in CO_2 che viene allontanato dalla soluzione facendo gorgogliare un gas, aria purissima (6.6) o altro gas esente da CO_2 e idrocarburi, per 10 minuti. Iniettare quindi il campione nel tubo di combustione seguendo le modalità indicate per il carbonio totale. In questo caso, la frazione volatile del carbonio organico viene eliminata insieme al carbonio inorganico e si ottiene il NPOC ("not purgeable organic carbon"), per distinguerlo dal DOC indicato in precedenza.

8. Calcoli

8.1 Carbonio totale disciolto

Il valore medio dell'area del picco, corretto del valore del solo bianco strumentale o del bianco complessivo (bianco dell'acqua + bianco strumentale) qualora non sia possibile distinguere tra i due contributi e comunque nel caso in cui il valore complessivo sia inferiore a 15-20 µM e quindi possa essere attribuito in gran parte al bianco strumentale, consente di ricavare dalla curva di taratura (7.1.1) la concentrazione di carbonio totale disciolto (DC) nel campione in esame, espressa im mg/L.

8.2 Carbonio inorganico disciolto

Dal valore medio dell'area del picco, corretto del valore del bianco strumentale (in questo caso la procedura di acidificazione e insufflazione con azoto o aria ultrapura consente di avere un'acqua esente da CO_2), ricavare mediante la curva di taratura (7.1.2) la concentrazione di carbonio inorganico disciolto (DIC) nel campione in esame, espressa in mg/L.

8.3 Carbonio organico disciolto

Il carbonio organico disciolto si ottiene dalla differenza:

$$DOC = DC - DIC$$

dove:
DOC = concentrazione (mg/L) di carbonio organico disciolto;
DC = concentrazione (mg/L) di carbonio totale disciolto;
DIC = concentrazione (mg/L) di carbonio inorganico disciolto.

Se il carbonio inorganico viene rimosso prima dell'analisi del campione, ricavare dalla curva di taratura 7.1.1 la concentrazione di mg/L di NPOC, espressa im mg/L.

9. Qualità del dato

Con gli analizzatori di carbonio attualmente disponibili è possibile ottenere una precisione, espressa come coefficiente di variazione, dell'1-2%. Misure di DOC effettuate da 59 laboratori su due campioni di acqua di mare, uno tal quale, l'altro addizionato con glucosio ad una concentrazione di 50 µmoli/L di C, hanno fornito un'accuratezza del ±10%.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard methods for the examination of water and wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA).

BENNER R. & STROM M. (1993): "A critical evaluation of the analytical blank associated with DOC measurements by high-temperature catalytic oxidation", *Mar. Chem.*, **41**, 153-160.

CAUWET G. (1994): "HTCO method for dissolved organic carbon analysis in seawater: influence of catalyst on blank estimation", *Mar. Chem.*, **47**, 55-64.

DONAHUE W.F., SCHINDLER D.W., PAGE S.J. & STAINTON M.P. (1998): "Acid-induced changes in DOC quality in an experimental whole lake manipulation", *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 2954-2960.

MILLER W.L. & MORAN M.A. (1997): " Interaction of photochemical and microbial process in the degradation of refractory dissolved organic matter from a coastal marine environment", *Limnol. Oceanogr.*, **42** (6), 1317-1324.

PELTZER E.T. & BREWER P.G. (1993): "Some practical aspects of measuring DOC: sampling artifacts and analytical problems with marine samples", *Mar. Chem.*, **41**, 243-252.

SHARP J.H., BENNER R., BENNETT L., CARLSON C.A., FITZWATER S.E., PELTZER E.T. & TUPAS L. M. (1995): "Analyses of dissolved organic carbon in seawater: the JGOFS EqPac methods comparison", *Mar. Chem.*, **48**, 91-108.

STRICKLAND J.D.H. & PARSONS T.R. (1968): "*A practical handbook of seawater analysis*", Fisheries Research Board of Canada, **167**, 153.

TUPAS L.M., POPP B.N. & DAVID M.K. (1994): "Dissolved organic carbon in oligotrophic waters: experiments on sample preservation, storage and analysis", *Mar. Chem.*, **45**, 207-216.

WETZEL R.G. & LIKENS G.E. (1991): "*Limnological analyses*", Springer.

5050. Diserbanti ureici

Introduzione

I diserbanti fenilureici, tra cui il più utilizzato in Italia è il Linuron, sono erbicidi selettivi, impiegati in pre- e post-emergenza per il controllo di un'ampia varietà di colture quali quelle orticole (patate, carote, pomodori, ecc.), floreali, intensive (mais, frumento, orzo, soia, girasole) e frutteti.
Il loro meccanismo d'azione si esplica attraverso l'inibizione della fotosintesi mediante assorbimento radicale o per contatto sulle superfici fogliari delle infestanti. Nell'ambiente, questi composti sono rapidamente degradati per fotolisi, come descritto in diversi studi già da tempo effettuati, particolarmente in soluzione acquosa. Anche i microorganismi giocano un ruolo importante nella degradazione delle feniluree. La loro azione, che è molto complessa, si esplica attraverso diversi possibili meccanismi, che dipendono da numerosi fattori, quali la temperatura, il pH del terreno, la presenza di nutrienti o di sostanze tossiche, le caratteristiche di adsorbimento e deadsorbimento da parte delle particelle del terreno.
Accanto alle feniluree, sono state recentemente immesse sul mercato le solfoniluree, caratterizzate da bassi quantitativi d'uso ed alta fitotossicità. A causa della loro alta selettività verso le infestanti e la loro bassa tossicità versi i mammiferi, questi diserbanti sono diventati i nuovi sostituti di alcuni vecchi composti come le triazine e i clorofenossicarbossilici.
Le solfoniluree sono usate in pre- e post-emergenza, per il controllo dei cereali, in particolare del riso, delle patate e della barbabietola da zucchero. La loro attività erbicida è dovuta alla rapida inibizione di un enzima, Acetolattato Sintetasi (ALS), necessario per la sintesi di aminoacidi essenziali per la crescita delle piante.
Poiché questi composti sono termicamente instabili, la loro determinazione per via gascromatografica è generalmente preceduta da derivatizzazione o idrolisi. Al contrario, la cromatografia liquida permette di determinare direttamente la loro presenza, dopo aver effettuato una efficace preconcentrazione del campione, per poter raggiungere bassi livelli di rilevabilità.

1. Principio del metodo

I diserbanti fenil e solfonilureici vengono estratti dalla matrice acquosa mediante estrazione liquido/liquido o estrazione in fase solida (SPE) ed analizzati in cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) con rivelatore UV, possibilmente con Diode Array (UV-DAD). I costituenti sono separati in gradiente di eluizione e quantificati per confronto tra le aree dei rispettivi picchi cromatografici e quelle delle relative soluzioni di riferimento, sulla base di opportune rette di taratura. Per una migliore accuratezza del metodo, si può utilizzare come riferimento interno, aggiunto nel campione acquoso, immediatamente prima dell'estrazione, il Monolinuron (erbicida non in vendita in Italia). I risultati sono espressi in µg/L per ciascun principio attivo.

2. Campo di applicazione

Il metodo viene applicato alle acque naturali (superficiali, sotterranee) e di scarico, nell'intervallo di concentrazione compreso tra 0,1 µg/L e 50 µg/L. La quantità iniziale di campione da estrarre può variare da 100 mL a 2000 mL, in relazione alla complessità della matrice da

Tabella 1: Principi attivi

	Composto
1	Diuron
2	Isoproturon
3	Metobromuron
4	Linuron
5	Tifensulfuron metile
6	Metasulfuron metile
7	Cinosulfuron
8	Clorsulfuron
9	Rimsulfuron
10	Bensulfuron metile

esaminare ed alla concentrazione degli analiti. I principi attivi ricercati, appartenenti a queste categorie, sono riportati in Tab. 1.

3. Interferenze e cause di errore

Composti organici con tempi di ritenzione simili o identici a quelli degli analiti di interesse possono interferire con la determinazione. Per i picchi con tempo di ritenzione uguale al riferimento, è opportuno verificarne la presenza variando le condizioni cromatografiche ed usando una colonna di diversa polarità. Il sistema UV-DAD, che permette di richiamare lo spettro di assorbimento dei composti rilevati, consente di stabilire se il picco con lo stesso tempo di ritenzione del riferimento corrisponde effettivamente al composto ricercato. Nel caso di sovrapposizioni parziali di picchi, si dovranno considerare accettabili, per la quantificazione, quelli con una risoluzione superiore al 70% oppure utilizzare un "software" dedicato per la lettura della deconvoluzione dei segnali parzialmente sovrapposti.
La presenza di picchi interferenti, dovuti alla contaminazione dell'ambiente di lavoro, può essere mantenuta sotto controllo mediante l'effettuazione di uno o più bianchi, ottenuti sottoponendo ad analisi completa campioni di acqua distillata esente da sostanze organiche.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il prelievo dei campioni dovrà essere effettuato in bottiglie di vetro scuro, con chiusura a smeriglio oppure a vite con guarnizione di teflon. La concentrazione di diserbanti presenti può essere diminuita dall'attività biologica del campione, pertanto si dovrà procedere all'analisi nel minor tempo possibile dopo il prelievo (al massimo 48 ore), mantenendo i campioni fino al momento dell'analisi a 4°C e al riparo dalla luce.
Se non è possibile analizzare il campione in breve tempo è consigliabile effettuare almeno l'estrazione e conservare l'estratto a 4°C, oppure verificare la stabilità del campione aggiungendo un riferimento interno, ad esempio Monolinuron, o comunque un composto con comportamento chimico–fisico equivalente.

5. Apparecchiature

5.1 Cromatografo liquido ad alta prestazione (HPLC) con rivelatore UV a lunghezza d'onda variabile o a serie di diodi. Si consiglia l'uso di una colonna di separazione a fase inversa con resina del tipo C_8, C_{18}, fenil, ciano. La colonna deve essere in grado di fornire un'adeguata efficienza e risoluzione nella separazione dei picchi degli analiti. La fase mobile, la composizione e la durata del gradiente ed il flusso di lavoro sono correlati al tipo e dimensioni della colonna utilizzata. Il sistema di acquisizione dei dati può essere costituito da personal computer o integratore.

5.2 Adsorbenti per l'estrazione SPE, costituiti da silice legata a catene a 8 o 18 atomi di

carbonio, resine stirene divinilbenzene, su supporti a disco o in cartucce, e cartucce di carbone grafitato. La procedura di condizionamento, estrazione ed eluizione viene effettuata sotto vuoto, secondo le modalità consigliate dal produttore, montando il supporto del materiale adsorbente su una beuta da vuoto o su un sistema multiplo per estrazione liquido-solido, disponibile in commercio.

5.3 *Normale vetreria da laboratorio* di classe A.

5.4 *Bilancia analitica,* risoluzione 0,1 mg.

5.5 *Evaporatore rotante*

6. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e l'acqua deve essere esente da sostanze organiche.

6.1 *Acetone, etile acetato, metanolo, diclorometano* puri per pesticidi.

6.2 *Acetonitrile per HPLC*

6.3 *HCl, NaCl e* Na_2SO_4

6.4 *Filtri in fibra di vetro o polvere di vetro* con particelle da 40 microns di diametro, da utilizzare per la filtrazione in linea delle acque contenenti solidi sospesi particellari o colloidali.

6.5 *Acido acetico glaciale*

6.6 Soluzioni di riferimento (*Diserbanti ureici* con purezza non inferiore al 95%, possibilmente certificati).

6.6.1 Soluzioni concentrate di diserbanti ureici

Pesare 10 mg di ognuno dei principi attivi della Tabella 1 sopramenzionata, trasferirli in matracci tarati da 100 mL e portare a volume con acetonitrile. Queste soluzioni possono essere conservate a 4°C per tre mesi.

6.6.2 Soluzioni di riferimento

Preparare un minimo di tre soluzioni di riferimento contenenti gli analiti in miscela, aggiungendo accuratamente, in funzione della concentrazione degli analiti desiderata, volumi misurati delle singole soluzioni concentrate (6.6.1) in matracci tarati, portando poi a volume con acetonitrile.
È consigliabile costruire rette di taratura lineari non superiori ad un ordine di grandezza, ad esempio da 0,1 mg/L a 1 mg/L con almeno un punto intermedio (ad esempio 0,5 mg/L).
Le soluzioni di lavoro possono essere conservate a 4°C per circa un mese.

7. Procedimento

7.1 *Trattamento preliminare del campione*

Portare tutte le soluzioni di riferimento (6.6.2) ed i campioni a temperatura ambiente prima di iniziare ogni analisi.

Prima dell'estrazione, agitare il campione per ottenere una maggiore omogeneità. Se si utilizza il riferimento interno, aggiungere un volume idoneo di soluzione, in modo che la sua concentrazione finale, dopo la procedura di estrazione, sia la stessa usata nelle soluzioni di riferimento (6.6.2).

7.1.1 Estrazione liquido/liquido

Un litro di campione viene addizionato con 50 mL di una soluzione satura di sodio cloruro ed estratto in imbuto separatore, o con analogo dispositivo idoneo all'estrazione liquido/liquido, con 100 mL di etile acetato. La fase acquosa, successivamente portata a pH acido (circa 2) con acido cloridrico, è estratta con una seconda aliquota da 100 mL di etile acetato. Gli estratti riuniti, anidrificati con solfato di sodio anidro e portati a secchezza mediante evaporatore rotante in bagno termostatico a 35°C, seccati in corrente di azoto, sono ripresi con 1 mL di acetonitrile. L'estratto ottenuto è analizzato mediante HPLC-UV.
La Fig. 1 mostra una tipica separazione dei principi attivi in esame, con questa procedura.

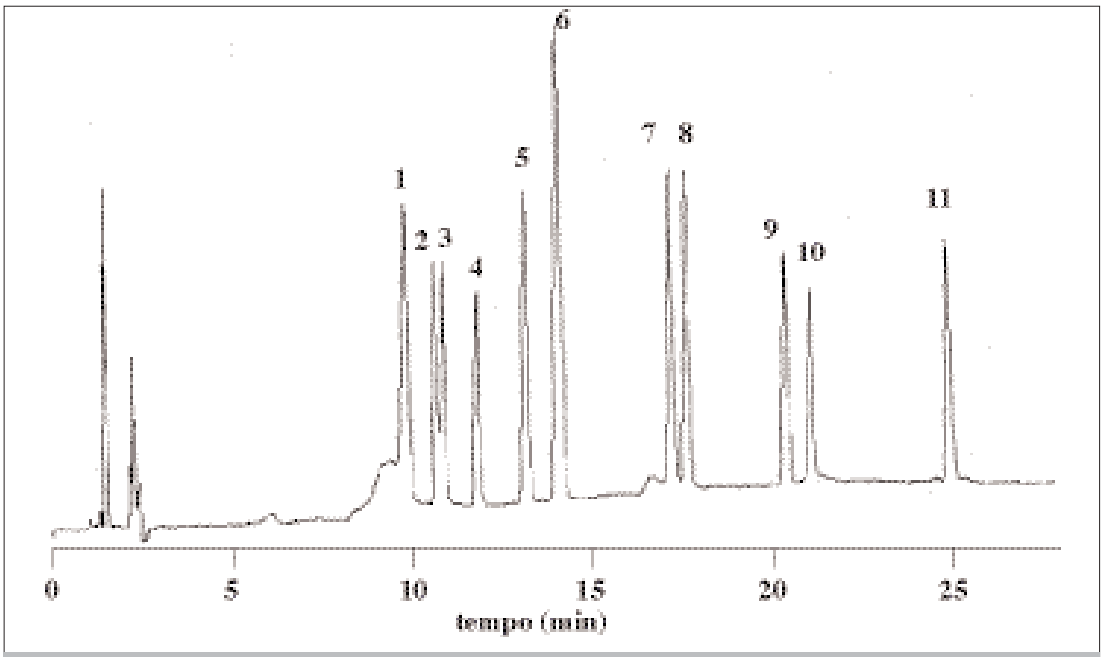


Figura 1: Cromatogramma, ottenuto a 240 nm, di un litro di acqua superficiale contaminato con 10 µg/L di ciascun principio attivo di Tab. 1, estratto con tecnica liquido/liquido. Condizioni analitiche: colonna cromatografica Hypersil ODS, 200x2,1 mm, dimensione particelle 5 µm, flusso 1,2 mL/min. Gradiente (acetonitrile + acido acetico 1%/acqua + acido acetico 1%): da 15:85 (inizio gradiente) a 65:35 in 50 min, volume iniettato 10 µL.

7.1.2 Estrazione in fase solida con resine stirene-divinilbenzene (SDVB)

Lavare e condizionare il substrato adsorbente con metanolo seguito da acqua ultrapura.
Filtrare attraverso la fase solida, con un flusso non superiore a 3 mL/min, un volume noto di campione, variabile da 100 mL a 1000 mL in relazione alla complessità della matrice. Nel caso di campioni contenenti materiale in sospensione, è consigliabile utilizzare filtri in fibra di vetro o polvere di vetro in linea al substrato adsorbente, in modo tale da effettuare una preventiva filtrazione del particolato che potrebbe intasare il substrato stesso, e da consentirne l'estrazione all'atto del passaggio dell'eluente.
Far passare aria per 30 minuti attraverso l'adsorbente in modo da eliminare le tracce di acqua trattenuta ed eluire gli analiti mediante due aggiunte successive, con un intervallo di 5 minuti tra l'una e l'altra, di 2,5 mL di una soluzione acetonitrile/metanolo 1:1 (v/v).
Evaporare a piccolo volume l'eluato sotto debole corrente d'azoto a temperatura ambiente e portare a un volume finale di 1 mL con acqua distillata, esente da sostanze organiche.

Come riferimento interno (surrogato) può essere utilizzato Monolinuron (erbicida non in vendita in Italia) aggiunto al campione nel momento dell'arrivo in laboratorio, in modo da verificare la stabilità del campione stesso e l'efficacia dell'estrazione.
La Fig. 2 mostra una tipica separazione di diserbanti fenilureici con questa procedura.

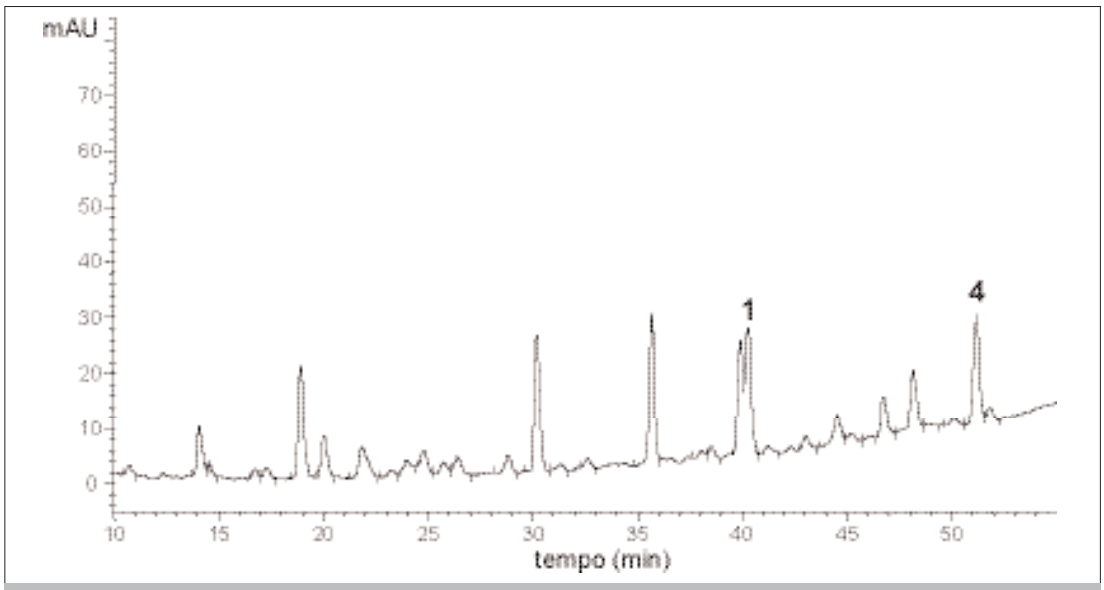


Figura 2: Cromatogramma, ottenuto a 250 nm, di un campione di acqua di falda superficiale contaminato con 1 µg/L di ciascun composto, estratto con cartuccia LiChrolut EN (Merck, Germania) da 200 mg. Condizioni analitiche: colonna cromatografica Lichrosphere 5100 C18 (HPLC Technology, Gran Bretagna) 250 x 4,6 mm, dimensione particelle 5 µm, flusso 0,7 mL/min. Gradiente (acqua/acetonitrile) da 40:60 (inizio gradiente) a 75:25 in 20 min, volume iniettato 25 µL. I picchi non contrassegnati dal numero si riferiscono a metaboliti ureici non inseriti nel gruppo degli analiti considerati nel presente metodo.

7.1.3 Estrazione SPE con cartuccia di carbone grafitato

Per l'estrazione in fase solida, possono essere utilizzate le cartucce SPE in carbone grafitato disponibili in commercio (0,5 g).
Condizionare la cartuccia SPE con 8 mL di fase eluente (diclorometano/metanolo 80:20 (v/v), acidificato con acido acetico 10 mmoli/L), 2 mL di metanolo e 20 mL di acqua distillata (acidificata a pH=2). Far passare il campione (500 mL o 50 mL, rispettivamente per acque superficiali o di scarico), attraverso la cartuccia SPE ad un flusso di 70-100 mL/min. Staccare la pompa e riempire la cartuccia con 20 mL di acqua distillata, che viene fatta passare attraverso il carbone ad un flusso di 5 mL/min. Portare a secco il substrato adsorbente sotto vuoto per un minuto. Far passare 0,5 mL di metanolo per gravità e portare a secco il substrato adsorbente sotto vuoto per un minuto. Invertire la cartuccia introducendo in essa un pistone cilindrico di teflon, avente base conica e una punta di tipo Luer, fino a venire a contatto con il setto superiore della cartuccia stessa. Eluire le solfoniluree con 8 mL di una miscela diclorometano/metanolo 80:20 (v/v), acidificata con acido acetico 10 mmoli/L, raccogliendo l'eluato in una provetta. Evaporare a secchezza a 40°C con un moderato flusso di azoto. Non lasciare la provetta per più di un minuto nel bagno termostatico dopo la totale evaporazione del solvente. Riprendere il residuo con 200 µL di una miscela acqua/acetonitrile (80:20 v/v) acidificata con acido acetico 2 mmoli/L ed analizzarlo mediante HPLC-UV.
La Fig. 3 mostra una tipica separazione di diserbanti solfonilureici con questa procedura.

7.2 Analisi

Dopo aver impostato le condizioni cromatografiche, attendere che il sistema sia stabilizzato, controllando la linearità della linea di base, quindi iniettare la miscela dei principi attivi esaminati a tre o più livelli di concentrazione, per la costruzione della retta di taratura.

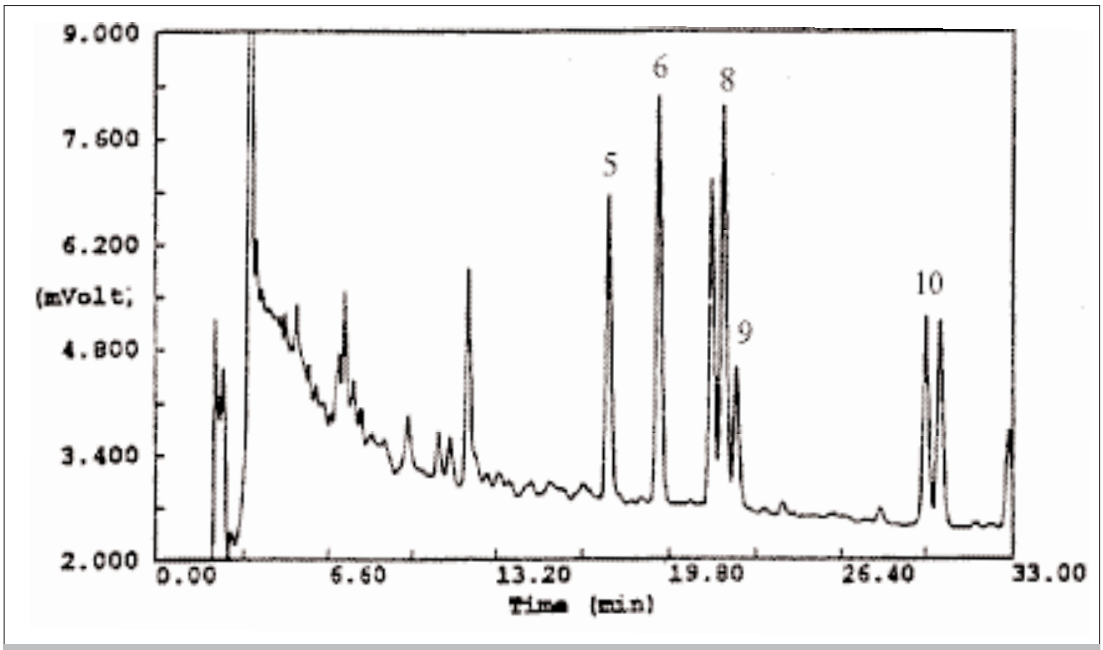


Figura 3: Cromatogramma, ottenuto a 230 nm, di 0,5 L di un campione di acqua superficiale contaminato con 2 µg/L di 5 solfoniluree tra quelle esaminate ed estratto con una cartuccia di carbone grafitato "Carbograph-4" da 500 mg. Condizioni analitiche: colonna cromatografica Alltech Alltima C18, 250 x 4,6 mm, dimensione particelle 5 µm, flusso 1 mL/min. Gradiente (acetonitrile + TFA 3 mmoli/L / acqua + TFA 3 mmoli/L): da 32:68 (inizio gradiente) a 62:38 in 40 min, volume iniettato 50 µL.

Verificare la presenza di eventuali interferenti dovuti al processo, mediante l'iniezione di un campione d'acqua esente da sostanze organiche estratto con le stesse modalità del campione ("bianco").
Iniettare i campioni ed effettuare l'eventuale riconoscimento qualitativo per confronto con i tempi di ritenzione delle soluzioni di riferimento. Nei casi di positività, qualora si operi con un sistema UV-DAD, è possibile richiamare lo spettro di assorbimento del picco cromatografico con lo stesso tempo di ritenzione del riferimento e verificarne la sovrapponibilità con lo spettro del riferimento stesso. In assenza di sistema DAD, ripetere l'analisi cromatografica con un'altra colonna di differente polarità.
Completata l'identificazione qualitativa dei picchi, procedere all'analisi quantitativa, introducendo nel cromatografo volumi uguali di campione e di soluzioni di riferimento. Preparare almeno 3 miscele di riferimento dei principi attivi (vedi Sottoparagrafo 6.6.2) ad opportune concentrazioni. Costruire quindi le rette di taratura per i singoli composti, accertandosi di operare nel campo di linearità dello strumento, riportando in grafico l'area del picco del componente (A) in funzione della concentrazione del componente stesso ed interpolando i punti sperimentali con il metodo dei minimi quadrati. Ricavare il coefficiente angolare (a) e l'intercetta (b) della retta di taratura.

8. Calcoli

La concentrazione incognita di ogni componente è data dalla relazione:

$$C = \frac{A - b}{a} \cdot \frac{V_f}{V_i}$$

dove:
C = concentrazione (µg/L) di diserbante;
A = area del picco del diserbante nella miscela incognita;
b = valore dell'intercetta della retta di taratura;

a = valore del coefficiente angolare della retta di taratura;
V_f = volume (mL) dell'estratto finale;
V_i = volume (mL) del campione acquoso.

Nel caso in cui si utilizzi il riferimento interno, si riporta in grafico il rapporto area picco componente/area picco di riferimento interno (A/A_{si}) in funzione della concentrazione del componente stesso. La concentrazione incognita di ogni componente è data dalla relazione:

$$C = \frac{A/A_{si} - b}{a} \cdot \frac{V_f}{V_i}$$

dove:
C = concentrazione (µg/L) di diserbante;
A = area del picco del diserbante nella miscela incognita;
A_{si} = area del picco del riferimento interno nella miscela incognita;
b = valore dell'intercetta della retta di taratura;
a = valore del coefficiente angolare della retta di taratura;
V_f = volume (mL) dell'estratto finale;
V_i = volume (mL) del campione acquoso.

Accertarsi che la concentrazione del campione sia all'interno dell'intervallo di concentrazione utilizzato per la curva di taratura.

9. Qualità del dato

La precisione del metodo è calcolata mediante misure di ripetibilità del dato, ottenute iniettando campioni di acqua superficiale incrementati a due diversi livelli di concentrazione ed estratti. Il procedimento è ripetuto su almeno cinque aliquote di campione a ciascuna concentrazione.
Le procedure sperimentali sopra riportate sono state verificate mediante una sperimentazione che ha consentito di stabilire che i recuperi dei vari composti fenilureici sono superiori all'80% con un coefficiente di variazione inferiore al 10%. Per le solfoniluree, estratte con il metodo liquido/liquido, i recuperi sono superiori al 70% con un coefficiente di variazione inferiore al 12%.
L'accuratezza del metodo è ottenuta dal recupero medio percentuale delle prove effettuate sulle diverse aliquote dei due campioni incrementati.
Per verificare l'efficacia dell'estrazione, è conveniente effettuare, contemporaneamente ai campioni, l'analisi di un "bianco" incrementato con la miscela dei composti di interesse, alla concentrazione più vicina possibile a quella presunta dei campioni stessi.
Il limite di rivelabilità del metodo calcolato per acque naturali è di 0,1 µg/L, mentre per le acque di scarico è di 1 µg/L.

Nota: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".*
Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

BIBLIOGRAFIA

BORGAARD O.K. & STREIBIG J.C. (1989): "Chlorsulfuron adsorption by selected soil samples", *Acta Agriculturae Scandinavica*, **39**, 351-360.

BROWN H. (1990): "Mode of action, crops selectivity and soil relations of the sulfonylurea herbicides", *Pesticide Science*, **29**, 263-281.

CORBETT J.R., WRIGHT K. & BAILLE A.C., (1984): "*The Biochemical Mode of Action of Pesticides*", Academic Press, New York, 2nd ed., 56.

DI CORCIA A., CRESCENZI C., SAMPERI R. & SCAPPATICCIO L. (1997): "Trace analysis of sulfonylurea herbicides in water: extraction and purification by a Carbograph 4 cartridge, followed by liquid chromatography with UV detection, and confirmatory analysis by an Electrospray/Mass Detector", *Anal. Chem.*, **69**, 2819-2826.

DI CORCIA A. & MARCHETTI M. (1991): "Rapid and sensitive determination of phenylurea herbicides in water in the presence of their anilines by extraction with a Carbopack cartridge followed by liquid chromatography", *J. Chrom.*, **541**, 365-373.

KHADRANI A., SEIGLE-MURANDI F., STEIMAN R. & VROUMSIA T. (1999): "Degradation of three phenylurea herbicides (chlortoluron, isoproturon and diuron) by micromycetes isolated from soil", *Chemosphere*, **38**, (13), 3041-3050.

MANSOUR M., FEICHT E.A., BEHECHTI A. & SCHEUNERT I. (1997): "Experimental approaches to studying the photostability of selected pesticides in water and soil", *Chemosphere*, **35** (1-2), 39-50.

PIEUCHOT M., PERRIN-GANIER C., PORTAL J.M. & SCHIAVON M. (1996): "Study of the mineralization and degradation of isoproturon in three soils", *Chemosphere*, **33** (3) 467-478.

POZZONI F. & GUZZELLA L. (2000): "Tecniche di estrazione e concentrazione di fitofarmaci da campioni d'acqua e suolo", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **112**, 46-65.

RAY T.B. (1984): "Site of action of chlorsulfuron", *Plant Physiology*, **75**, 827-831.

ROSEN D.J., STRUSZ R.F. & STILL C.C. (1969): "Photolysis of phenylurea herbicides", *J. Agric. Food Chem.*, **17**, 206-207.

TANAKA F.S., WIEN R.G. & HOFFER B.L. (1984): "Biphenyl formation in the photolysis of aqueous herbicide solutions", *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, **23**, 1-5.

WALKER A. & WELCH S.J. (1992): "Further studies of the enhanced biodegradation of some soil-applied herbicides", *Weed Res.*, **32**, 19-27.

5060. Prodotti fitosanitari (Antiparassitari, pesticidi)

1. Principio del metodo

Recentemente, per la determinazione dei prodotti fitosanitari nelle acque, sono stati proposti vari metodi multiresidui che utilizzano diverse procedure di estrazione delle sostanze attive e diverse tecniche analitiche.
Poiché tutti questi metodi presentano indubbi vantaggi, nello schema analitico che proponiamo si è ritenuto opportuno lasciare all'operatore una certa discrezionalità nella scelta delle procedure.
Vengono quindi proposte diverse soluzioni, da scegliere anche in funzione della strumentazione disponibile in laboratorio.
Per quanto concerne la procedura di estrazione, potrà essere utilizzata la tecnica liquido/liquido o l'estrazione in fase solida con l'ausilio di supporti di prefiltrazione, in linea con il substrato adsorbente, (quale ad esempio fibra di vetro in polvere) in modo da permettere il passaggio finale dell'eluente. Questo accorgimento è reso necessario dal fatto che la presenza di materiale in sospensione potrebbe creare problemi nell'adsorbimento su fase solida e successiva eluizione (ostruzione parziale o totale durante il passaggio del campione).
Poichè l'analisi di estratti da matrici acquose ha messo in evidenza la possibilità della presenza di composti interferenti, si è ritenuto opportuno prevedere nel metodo un'analisi di conferma. Detta analisi si basa sull'impiego di tecniche di separazione diverse (gascromatografia ed HPLC), di colonne a diversa polarità nell'ambito della stessa tecnica analitica e, qualora sia possibile, per una identificazione più certa, della spettrometria di massa come sistema di rivelazione (GC/MS).
Il metodo descritto nel seguito riguarda un sottoinsieme di sostanze attive (erbicidi azotati) che possono essere determinate in gascromatografia con rivelatore NPD o in cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC). È possibile l'estensione del presente metodo ad altre sostanze attive, come specificato in Appendice, utilizzando le stesse tecniche di estrazione indicate nel metodo. In essa si riporta anche un cromatogramma esemplificativo, riguardante un'ampia gamma di sostanze attive, compresi gli erbicidi azotati, ottenuto mediante analisi in gascromatografia con rivelazione di massa (GC/MS).

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile alle acque di scarico e consente l'analisi degli erbicidi riportati in Tab. 1 con un limite di quantificazione di 1 µg/L, partendo da un campione di 100 mL.
Inoltre, il metodo è applicabile anche alle acque superficiali, sotterranee e potabili e consente l'analisi con un limite di quantificazione, per ciascun analita, di 0,05 µg/L, partendo da un campione di 500-2000 mL.

3. Interferenze e cause di errore

Le più comuni interferenze sinora segnalate, nel caso di analisi con rivelatore selettivo al fosforo ed all'azoto, sono rappresentate dagli insetticidi organofosforici (tipo Parathion, Malathion ecc.), dagli alchil e alchilarilfosfati, dagli aloalchil e aloalchilarilfosfati e dai mercaptobenzotiazoli.

Tabella 1: Erbicidi determinabili con il metodo proposto

Erbicida	Formula bruta	Nome chimico (C.A.)
Atrazina	$C_8H_{14}ClN_5$	2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina
Atrazina deetilata (metabolita)	$C_6H_9ClN_5$	2-cloro-4-amino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina
Atrazina deisopropilata (metabolita)	$C_5H_7ClN_5$	2-cloro-4-etilamino-6-amino-1,3,5-triazina
Propazina**	$C_9H_{16}ClN_5$	2-cloro-4,6-bis (isopropilamino)-1,3,5-triazina
Simazina	$C_7H_{12}ClN_5$	2-cloro-4,6-bis(etilamino)-1,3,5-triazina
Terbutilazina	$C_9H_{16}ClN_5$	2-cloro-4-etilamino-6-ter-butilamino-1,3,5-triazina
Terbutilazina deetilata (metabolita)	$C_7H_{12}ClN_5$	2-cloro-4-amino-6-ter-butilamino-1,3,5-triazina
Prometrina	$C_{10}H_{19}N_5S$	2,4-bis (isopropilamino)-6-metiltio-1,3,5-triazina
Cianazina	$C_9H_{13}ClN_6$	2-cloro-4 (1-ciano-1-metiletilamino)-6-etilamino-1,3,5-triazina
Pendimetalin	$C_{13}H_{19}N_3O_4$	N-(1-etilpropil)-2,6-dinitro-3,4-xilidina
Alaclor	$C_{14}H_2OClNO_2$	2-cloro-2′,6′-dietil-N-metossimetil-acetanilide
2,6-dietilanilina (metabolita)	$C_{10}H_{10}N$	
Metolaclor	$C_{15}H_{22}ClNO_2$	2-cloro-6′-etil-N(2-metossi-1-metiletil) aceto-o-toluidide
2-etil-6-metilanilina (metabolita)	C_9H_8N	
Molinate	$C_7H_{17}NOS$	S-etil peridroazepina-1-tiocarbossilato
Desmetrina	$C_8H_{15}N_5S$	2-isopropilamino-4-metilamino-6 metiltio-4,3,5-triazina
Ametrina	$C_9H_{17}N_5S$	2-etilamino-4-isopropilamino-6-metiltio-1,3,5–triazina
Terbutrina	$C_{10}H_{19}N_5S$	2-terbutilamino-4-etilamino-6-metiltio-1,3,5-triazina

(*) Chemical Abstracts
(**) Sostanza attiva non autorizzata in Italia

In particolare gli esteri fosforici sono molto diffusi e possono essere causa di contaminazione anche attraverso i materiali di laboratorio.
Per eliminare l'interferenza di molti di questi composti (alchil ed aloalchilfosfati, ecc.) si può effettuare l'analisi in HPLC, dal momento che essi non vengono rivelati in UV.
Per campioni particolarmente complessi è possibile operare la purificazione e frazionamento dell'estratto su microcolonna di gel di silice, secondo la procedura proposta da Leoni e collaboratori.

4. Campionamento e conservazione del campione

I campioni vengono prelevati in bottiglie di vetro neutro, possibilmente scuro, con chiusura a smeriglio oppure a vite.
Essi debbono essere conservati in frigorifero fino al momento dell'estrazione, che deve essere eseguita preferibilmente entro 48 ore dal prelievo.

5. Apparecchiature

5.1 Gascromatografo

Si consiglia l'uso di colonne capillari e sistemi di iniezione "on column" o "split/splitless".
In Tab. 2 si riportano, a titolo di esempio, le condizioni operative tipiche per l'analisi in gascromatografia.

Tabella 2: Condizioni operative - GC	
Colonna:	metilfenilsilicone (es. SPB5, PS 255, o equivalente)
Colonna di conferma:	vinilsilicone (es. OV 1701, o equivalente)
Dimensioni colonna:	l = 25-30 m, d.i.=0,32 mm, spessore film=0,25-0,35 µm l = 30 m, d.i.=0,25 mm, spessore film=0,25 µm
Iniettore:	"on column" (le modalità di iniezione dipendono dalle caratteristiche costruttive dell'iniettore, comunque in genere si inietta al massimo 1 µL oppure: "split/splitless" ("splitless" valvola chiusa per 60 sec), temp. 250°C
Rivelatore:	-tipo: rivelatore azoto-fosforo (nitrogen-phosphorous detector NPD) -temp.: 250°C -flussi: idrogeno e aria secondo il rapporto suggerito dal costruttore (di solito da 1:10 a 1:20)
Gas di trasporto:	elio
Gas ausiliario:	elio o azoto; flusso: 30 mL/min (o secondo specifiche rivelatore)
Temperatura colonna:	programma: 80°C per 1 min, 15°C/min fino a 150°C, 150°C per 1 min, 3°C/min fino a 220°C, 220°C per 1 min, 20°C/min fino a 280°C (o altro programma di temperatura del quale si verifichi l'idoneità)

5.2 HPLC

Si consiglia l'uso di uno strumento dotato di rivelatore UV a lunghezza d'onda variabile e di colonne a fase inversa del tipo C_{18} o C_8 (per la messa a punto del metodo è stata utilizzata una colonna C_{18} di lunghezza 15 cm, diametro interno 4,6 mm, diametro particelle 5 µm).

Tabella 3: Condizioni operative - HPLC	
Colonna:	C_{18} (5 µm); l=15 cm
Miscela eluente:	metanolo:acetonitrile:acqua (40:20:40)
Flusso:	1 mL/min
Lunghezza d'onda rivelatore UV:	220 nm

5.3 Evaporatore rotante, con possibilità di operare con il vuoto, con bagno termostatico ed opportuno sistema per il recupero dei solventi.

5.4 Colonne cromatografiche

Colonne cromatografiche in vetro (h=30 cm, d.i.=4,2 mm) con parte inferiore sfinata (h=3,5 cm, d.i.=2 mm) e serbatoio solventi avente una capacità di circa 40 mL.

5.5 Provette da concentrazione in vetro ("vials"), da 5 mL, 10 mL, 15 mL e 25 mL, preferibilmente con gambo sfinato graduato a 0,5 mL ed 1 mL.

5.6 Normale vetreria di laboratorio

Dopo il lavaggio, la vetreria deve essere sciacquata con acqua bidistillata ed infine con acetone, prima dell'uso.

6. Reattivi

6.1 Diclorometano (tipo per determinazione residui pesticidi).

6.2 Etilacetato (tipo per determinazione residui pesticidi).

6.3 Acetonitrile (per HPLC)

6.4 Metanolo (per HPLC)

6.5 Acqua (per HPLC)

6.6 Sodio solfato anidro (tipo granulare per analisi di pesticidi).

Il prodotto va tenuto in muffola per almeno 3 ore a 550°C e successivamente conservato in contenitore di vetro a chiusura ermetica (precedentemente lavato come descritto sopra per la vetreria).

6.7 Adsorbenti per l'estrazione SPE

Costituiti da silice legata a catene a 8 o 18 atomi di carbonio, resine stirene divinilbenzene, su supporti a disco o in cartucce, e cartucce di carbone grafitato. La procedura di condizionamento, estrazione ed eluizione viene effettuata sotto vuoto, secondo le modalità riportate in bibliografia, montando il supporto del materiale adsorbente su una beuta da vuoto o su un sistema multiplo per estrazione liquido-solido, disponibile in commercio.

6.8 Filtri in fibra di vetro o polvere di vetro, con particelle da 40 µm di diametro, da utilizzare per la filtrazione in linea delle acque contenenti solidi sospesi particellari o colloidali.

6.9 Soluzioni di riferimento di erbicidi

Le sostanze attive, preferibilmente certificate o garantite, devono avere una purezza superiore al 98%.

6.9.1 Per analisi con tecniche gascromatografiche

Preparare le soluzioni di riferimento concentrate pesando 10 mg di ognuna delle sostanze attive costituenti la miscela, trasferendole in matraccio tarato (100 mL) e portando a volume con etilacetato o metanolo. Queste soluzioni possono essere conservate in frigorifero per tre mesi (ricontrollando gravimetricamente l'eventuale evaporazione del solvente).
Le soluzioni di riferimento diluite, a concentrazione di circa 0,2 ng/µL, 0,5 ng/µL, 1 ng/µL e 2 ng/µL, vengono ottenute per diluizioni successive delle soluzioni di riferimento concentrate impiegando come solvente sempre l'etilacetato. È preferibile che queste soluzioni siano preparate almeno una volta al mese o al momento dell'uso.
Si suggeriscono le seguenti miscele che tengono conto dei tempi di ritenzione relativi alle colonne consigliate:

A) Metilfenilsilicone	B) Metilfenilsilicone	C) Vinilsilicone
Molinate	Simazina	Atrazina
Atrazina deetilata	Atrazina	[Tris-2-cloroetilfosfato]
Terbutilazina deetilata	Terbutilazina	Alaclor
Propazina	Prometrina	Cianazina
Desmetrina	Alaclor	Atrazina deisopropilata
Ametrina	Metolaclor	Metolaclor
Terbutrina	Pendimetalin	2,6-dietilanilina
		2-etil-6-metilanilina

6.9.2 Per analisi in HPLC

Preparare le soluzioni di riferimento concentrate pesando 10 mg di ognuna delle sostanze attive, trasferendole in matraccio tarato (100 mL) e portando a volume con metanolo. Queste soluzioni possono essere conservate in frigorifero per tre mesi (ricontrollando gravimetricamente la eventuale evaporazione del solvente).

Le soluzioni di riferimento diluite, a concentrazione di circa 0,2 ng/µL, 0,5 ng/µL, 1 ng/µL e 2 ng/µL, vengono ottenute per diluizioni successive delle soluzioni concentrate sempre con metanolo. È preferibile che queste soluzioni siano preparate al momento dell'uso e comunque conservate in frigorifero per non più di un mese.

7. Procedimento

7.1 Estrazione liquido/liquido del campione

Trasferire 100 mL di campione d'acqua di scarico in un imbuto separatore da 250 mL ed estrarli per tre volte con diclorometano (50 + 25 + 25 mL), agitando energicamente ogni volta per 3 minuti. Nel caso di acque superficiali o potabili l'estrazione avviene in una bottiglia di vetro scuro da 2,5 L e successivamente il suo contenuto è trasferito in un imbuto separatore da 2,5 L. Lasciar poi separare le fasi raccogliendo gli estratti (filtrati su circa 20 g di solfato di sodio anidro) in un pallone da concentrazione. Evaporare poi in evaporatore rotante su bagno termostatico (40-45°C) e sotto vuoto leggero fino a circa 5 mL; quindi trasferire l'estratto nella provetta da concentrazione.

a) Analisi gascromatografiche: aggiungere nella provetta 1 mL di etilacetato e concentrare sino a circa 0,5 mL sotto moderato flusso di azoto, portando poi a 1 mL con etilacetato.

b) Analisi in HPLC: completare l'evaporazione sino quasi a secchezza sotto moderato flusso di azoto e riprendere poi portando al volume di 1 mL con metanolo.
Particolari cautele nella concentrazione degli estratti vanno prese quando si accerti la presenza di Molinate. Infatti considerevoli perdite dello stesso possono verificarsi durante la fase di concentrazione dell'estratto. Si consiglia quindi di evitare di portare a secco, concentrando nelle condizioni meno drastiche possibili.

7.2 Estrazione in fase solida del campione

Per questo tipo di estrazione, possono essere utilizzate resine stirene-divinilbenzene (SDVB), substrati octil o octadecilsilanici e carbone grafitato.
Le condizioni tipiche di estrazione prevedono per le acque sotterraneee e superficiali un fattore di concentrazione di 1000 partendo da un volume di 500-2000 mL di campione. Nel caso di campioni contenenti materiale in sospensione, è consigliabile utilizzare filtri in fibra di vetro o polvere di vetro in linea al substrato adsorbente, in modo tale da effettuare una preventiva filtrazione del particolato che potrebbe intasare il substrato stesso e da consentirne l'estrazione all'atto del passaggio dell'eluente (acetato di etile, metanolo, miscela diclorometano-metanolo).
Concentrare il solvente sotto debole corrente d'azoto a temperatura non superiore a 40°C e riprendere con il solvente più adatto al tipo di analisi cromatografica da condurre.
In Fig. 1 è riportata una tipica separazione gas cromatografica di erbicidi azotati, estratti da un campione di acqua superficiale utilizzando un substrato a base di resina stirene-divinilbenzene.

7.3 Analisi cromatografiche

7.3.1 Gascromatografia

In Tab. 4 sono riportati i tempi di ritenzione, relativi all'atrazina, degli erbicidi considerati in questo metodo e di altre sostanze che potrebbero interferire nelle determinazioni (tra parentesi in tabella: pesticidi organofosforici, alchilarilfosfati e aloalchilarilfosfati).

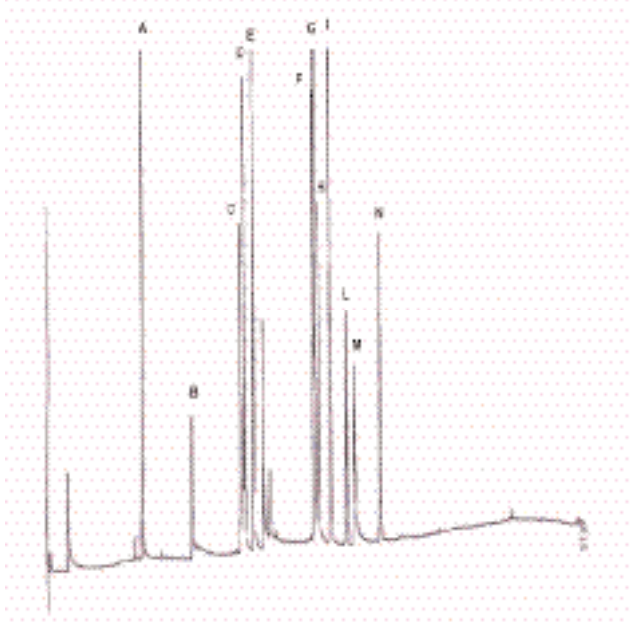


Figura 1: Gas cromatogramma ottenuto da 1 L di acqua superficiale contaminata con 1 µg/L degli erbicidi azotati indicati in Tab. 1, ad eccezione della deisopropilatrazina, mediante estrazione con resina stirene-divinilbenzene su disco in fibra di vetro. Condizioni gascromatografiche: colonna HP-5, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, "carrier" elio a 30 mL/min misurato a 50°C, temperatura iniettore 250°C, temperatura rivelatore NPD 270°C, temperatura iniziale 50°C per 2 min, rate A: 6°C/min fino a 140°C, rate B: 3°C/min fino a 230°C, rate C: 8°C/min fino a 290, temperatura finale 290°C per 2 min. A=molinate; B=desetilatrazina; C=atrazina; D=propazina; E=terbutilazina; F=alaclor; G=ametrina; H=prometrina; I=terbutrina; L=metolaclor; M=cianazina; N=pendimetalin.

Tabella 4: Tempi di ritenzione di erbicidi e di altri composti relativi all'atrazina*

Erbicidi ed altri composti	Colonne	
	OV 1701	SPB -5
2-etil-6-metilanilina	0,541	-
2,6-dietilanilina	0,598	-
(tri-iso-butilfosfato)	0,720	0,750
molinate	0,728	0,790
(tri-n-butilfosfato)	0,833	0,872
(forate)	0,879	0,967
(diazinone)	0,952	1,074
atrazina deetilata	0,952	0,900
atrazina deisopropilata	0,956	-
terbutilazina deetilata	0,966	-
Propazina	0,993	1,012
atrazina*	1[a]	1[b]
simazina	1,006	0,986
desmetrina	-	1,181
ametrina	-	1,247
terbutrina	-	1,298
(tris-monocloroisopropilfosfato)	1,06: 1,10; 1,12	1,05; 1,07; 1,072
(tris-2cloroetilfosfato)	1,092	0,988
(malation)	1,099	1,313
terbutilazina	1,015	1,042
alaclor	1,129	1,230
prometrina	1,131	1,250

segue

segue

Erbicidi ed altri composti	Colonne	
	OV 1701	SPB -5
metolaclor	1,213	1,399
(metilparathion)	1,233	1,215
pendimetalin	1,296	1,511
(paration)	1,299	1,378
cianazina	1,498	>2

a) circa 10 minuti; b) circa 20 minuti.

Per le condizioni generali cromatografiche si fa riferimento al Paragrafo (5.1), mentre nelle didascalie delle Fig. 2-4 sono indicate le specifiche condizioni utilizzate. Come già detto è consigliabile procedere sempre ad analisi di conferma impiegando una colonna di differente polarità.
Le Fig. 2-4 riportano i gascromatogrammi di miscele di riferimento di erbicidi in diverse condizioni operative e con differenti fasi stazionarie. Dette figure possono rappresentare inizialmente un punto di riferimento per l'operatore per scegliere le condizioni di lavoro più opportune al suo specifico problema.

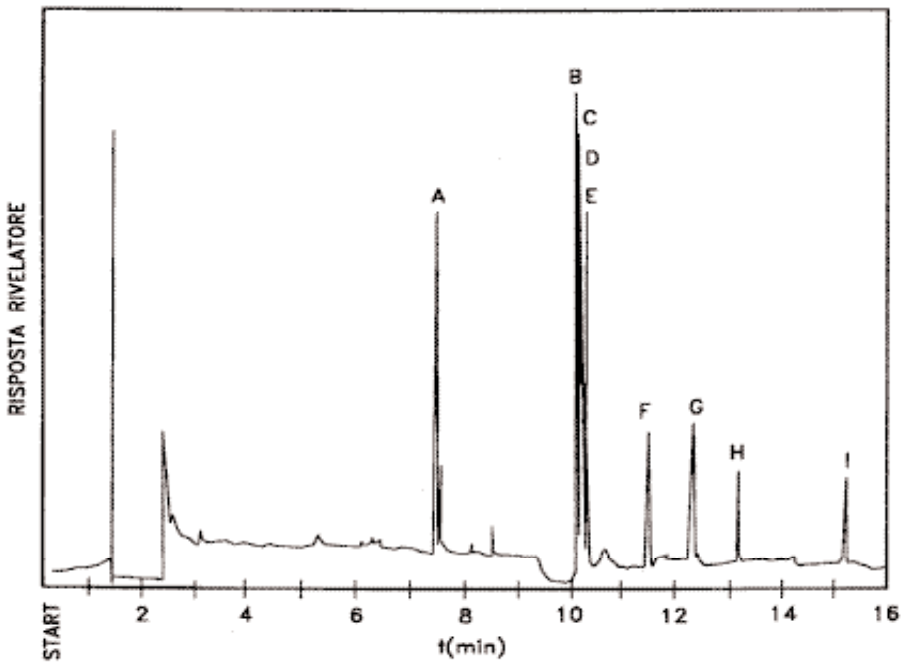


Figura 2: Gascromatogramma di una soluzione di riferimento di erbicidi su una colonna capillare OV 1701 (l=25 m, d.i.=0,32 mm). Condizioni operative: gas di trasporto = elio a 1 mL/min; temperatura programmata = 70→210°C, a 20°C/min e 210→250°C, a 4°C/min (A=molinate, B=propazina, C=atrazina, D=simazina, E=terbutilazina, F=alaclor, G=metolaclor, H=pendimetalin, I=cianazina).

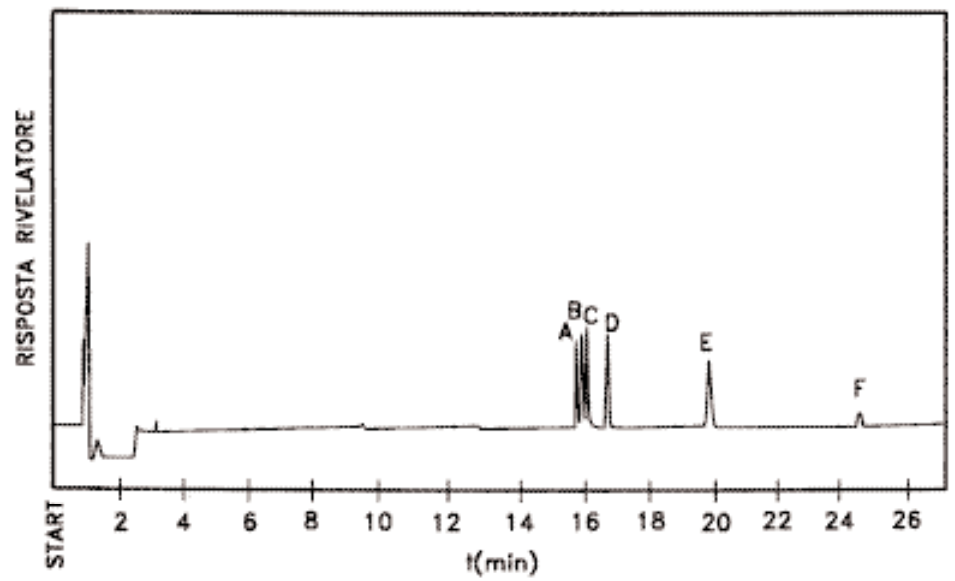


Figura 3: Gascromatogramma di erbicidi su colonna PS 255 (l=25 m, d.i.=0,32 mm). Condizioni operative: gas di trasporto = elio a 1 mL/min; temperatura programmata = 70→210°C, a 20°C/min e 210→250°C, a 4°C/min (A=simazina, B=atrazina, C=propazina, D=terbutilazina, E=prometrina, F=pendimetalin).

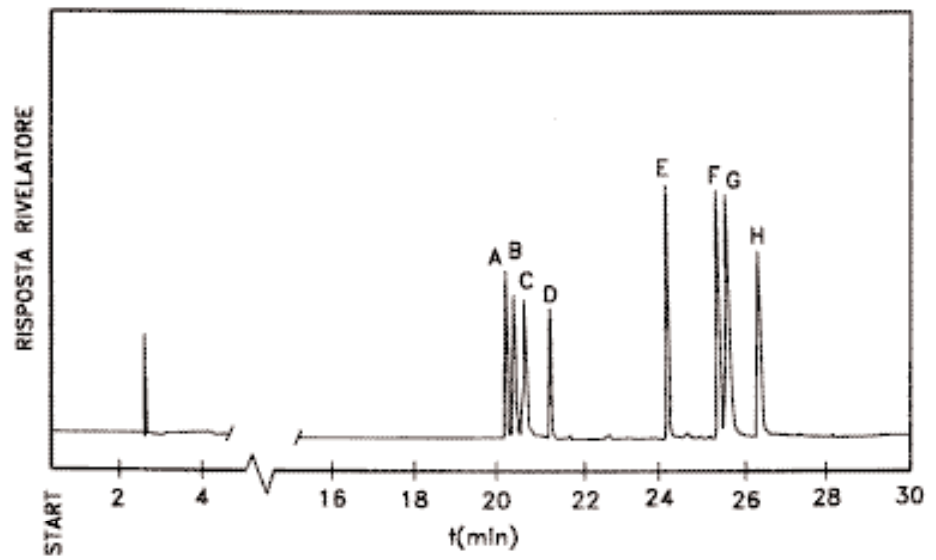


Figura 4: Gascromatogramma di erbicidi su colonna SBP (l=30 m, d.i.=0,32 mm, spessore film=0,25 μm). Condizioni operative: 80°C per 1 min; 80→150°, 15°C/min; 150°C per 1 min; 150→220°, 3°C/min; 220°C per 1 min; 220→280°, 20°C/min (A=simazina, B=atrazina, C=propazina, D=terbutilazina, E=desmetrina, F=ametrina, G=prometrina, H=terbutrina).

Utilizzando colonne capillari con fase stazionaria metilfenilsiliconica (SPB 5 o equivalente) si possono separare praticamente tutte le sostanze di interesse; tuttavia, per permettere una buona risoluzione delle triazine dal tris-2-cloroetilfosfato, un contaminante molto diffuso, è conveniente utilizzare anche la colonna di conferma con fase vinilsiliconica (OV 1701 o equivalente).

7.3.2 Cromatografia liquida (HPLC)

In Tab. 5 sono riportati i fattori di capacità (k′) su colonna a fase inversa (C_{18}) in HPLC nelle condizioni descritte nel Capitolo 5. Le Fig. 5 e 6 mostrano tipiche separazioni di erbicidi su colonne (C_{18}).

Tabella 5: Fattori di capacità (k′) in HPLC *

Principio attivo	Fattori di capacità (k′)
Atrazina deisopropilata	0,423
Atrazina deetilata	0,686
Terbutilazina deetilata	0,832
Simazina	1,372
Cianazina	1,385
Atrazina	2,109
Propazina	3,277
Terbutilazina	3,839
Prometrina	6,956
Alaclor	6,293
Metolaclor	6,827

** I k′ sono stati calcolati rispetto al tempo di ritenzione della formammide (1,37 min)*

8. Calcoli

Si può utilizzare il metodo del riferimento esterno iniettando volumi uguali di campione e di riferimento.
Preparare opportune miscele di riferimento delle sostanze attive (vedi Paragrafo 6.9), di composizione tale da non provocare sovrapposizioni di picchi ed a concentrazioni di circa 0,2 ng/µL, 0,5 ng/µL, 1ng/µL e 2 ng/µL per ogni singola sostanza attiva.
Ricavare quindi le curve di taratura per le singole sostanze attive calcolando i fattori di risposta e accertandosi di operare nel campo di linearità dello strumento.

9. Qualità del dato

La Tab. 6 riporta i risultati di alcune prove di recupero di miscele di erbicidi addizionati a campioni di acqua, mediante piccoli volumi di soluzioni di riferimento di essi, preparate in acetone in modo da avere concentrazioni comprese tra 0,1 µg/L e 2,0 µg/L. I dati, ottenuti mediante determinazioni gascromatografiche, si riferiscono a prove condotte su campioni di un litro di acqua potabile, estratto per tre volte con diclorometano (100 + 50 + 50 mL).
Per quanto concerne i dati di precisione ed accuratezza relativi alla procedura che impiega l'estrazione in fase solida, si rimanda ai riferimenti bibliografici.

Nota: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".*
Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

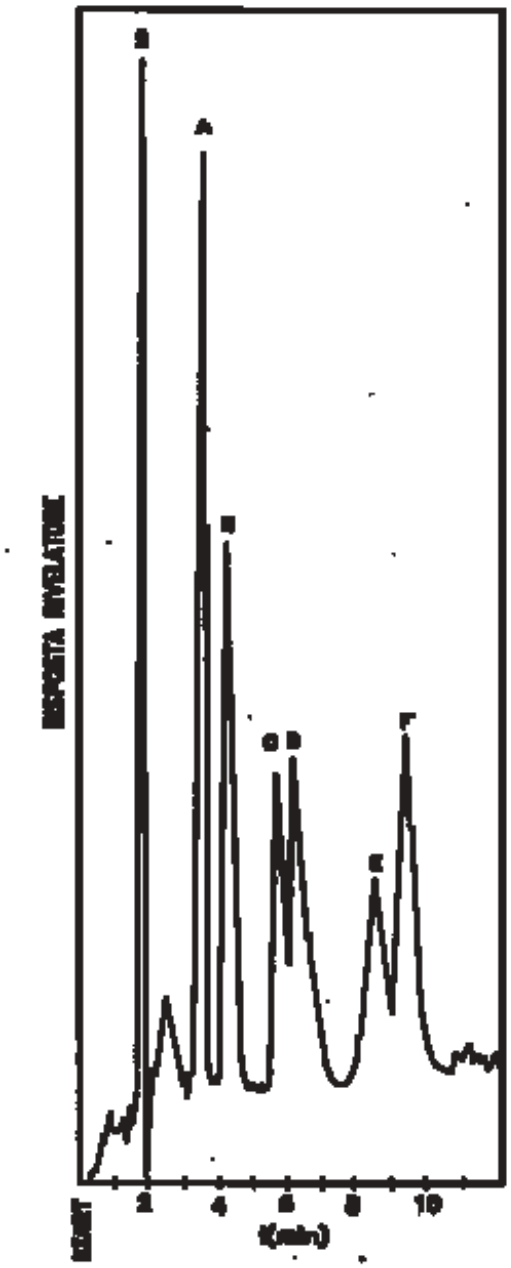


Figura 5: Cromatogramma HPLC di una miscela di sei erbicidi in metanolo (S) su colonna C18; l=15 cm, fase mobile: metanolo-acetonitrile-acqua (40:20:40). A=simazina; B=atrazina; C=propazina; D=terbutilazina; E=alaclor; F=metolaclor.

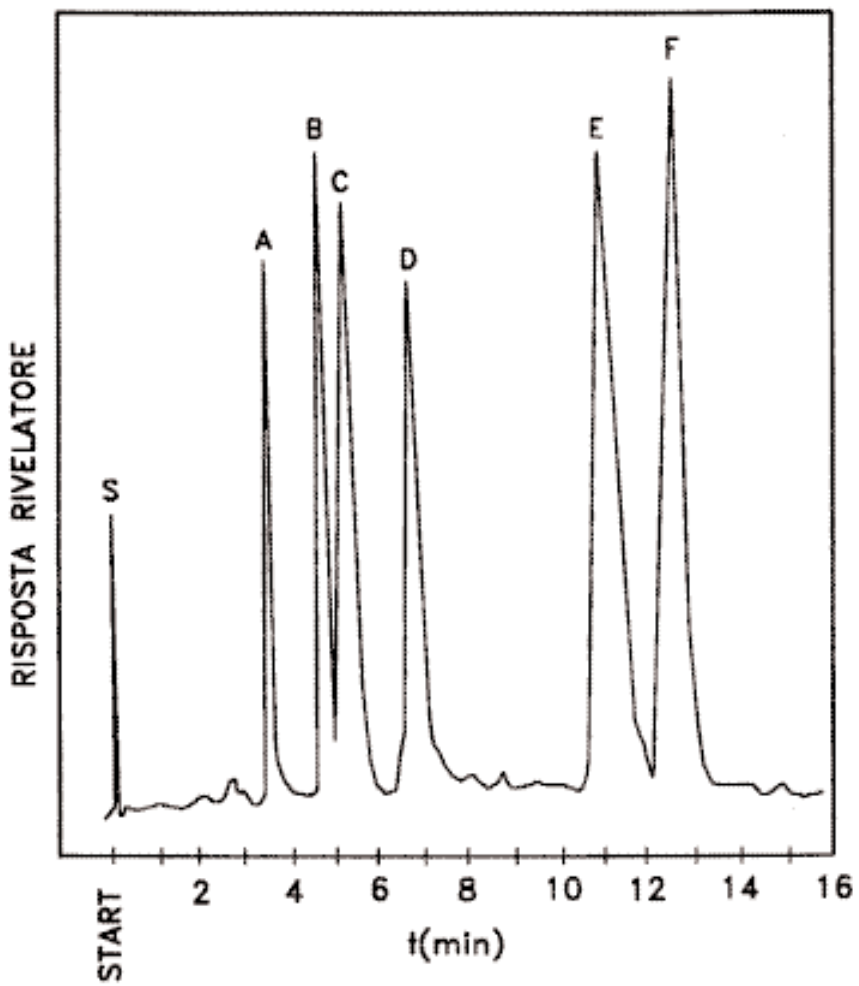


Figura 6: Cromatogramma HPLC di una miscela di sei triazine in metanolo (S) su colonna C18, l=15 cm, fase mobile: acqua-metanolo (65:35), flusso: 0,5 mL/min. A=simazina, B=atrazina, C=desmetrina, D=propazina, E=prometrina F=terbutrina.

Tabella 6: Valori % medi (n=3) ottenuti nelle prove di recupero

Principio attivo	0,1 µg/L	0,2 µg/L	0,5 µg/L	1,0 µg/L	2,0 µg/L
Atrazina	105,0	90,3	94,6	94,7	80,2
Simazina	91,6	93,9	103,4	96,5	91,7
Ametrina	87,1	97,7	103,1	96,7	102,5
Molinate		86,5	73,5	70,8	
Terbutrina		90,8	92,5	91,4	
Propazina		87,3		87,0	
Terbutilazina		103,5		104,2	
Trifluralin		88,0		88,9	
Desmetrina				99,8	
Prometrina				103,3	
Cianazina				97,5	
Clorsulfuron				100,7	
Alaclor				100,3	

BIBLIOGRAFIA

AKERBLOM M. & JONSALL G. (1990): "Multiresidue determination of pesticides in water", in: *Proceedings of the 7th International Congress of Pesticide Chemistry*, Hamburg, August.

BRANCA P. & QUAGLINO P. (1989): "Determinazione rapida di pesticidi organofosforati e diserbanti triazinici in acque ed alimenti", *Boll. Chim. Igien.*, **40**, 71-78 .

BROOKS M.W. et al. (1989): "Rapid Method for the Determination of Alachlor, Atrazine and Metholachlor in Groundwater by Solid-phase Extraction", *Analyst*, **11**, 405-406.

DAVÌ M.L. et al. (1999): "Multiresidue analysis of organic pollutants in water by SPE with a C8 and SDVB combined cartridge", *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **74**, 155-166.

DI CORCIA A., MARCHETTI M., CAPRI S. & LIBERATORI A. (1989): "Dosaggio di pesticidi nelle acque: estrazione per mezzo di una cartuccia di Carbopack B e quantificazione mediante HPLC", *IRSA-Notiziario Metodi Analitici per le Acque*, **9**(3), 43-55.

GALASSI S., BONIARDI N. & DE PAOLIS A. (1990): "Metodi multiresidui per l'analisi di erbicidi nelle acque", *Boll. Chim. Igien.*, **41**, 405-413.

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ (2000): "*Metodi Analitici per le acque destinate al consumo umano*", volume II, Rapporti Istisan 00/14, Pt. 1, 3-14.

LEONI V., CREMISINI C., CASUCCIO A. & GULLOTTI A. (1991): "The separation of Pesticides, Relate Compounds, Polychlorobiphenyls and Other Pollutants inl Four Groups by Silica-Gel Microcolumn Chromatography (Application to Surface Water Analysis)", *Pestic. Sci.*, **31**, 209-220.

PERUZZI M., BARTOLUCCI G. & CIONI F. (2000): "Determination of phenoxyalkanoic acids and other herbicides at the ng/ml level in water by solid-phase extraction with poly(diviniylbenzene-co-N-vinylpyrrolidone) sorbent and high-performance liquid chromatography-diode–array detection", *J. Chromatogr.*, A, **867**, 169-175.

POPL M. et al. (1983): "Determination of Triazines in Water by GC and LC", *J. Chromatogr. Sci.*, **21**, 39-42.

STEINHEIMER T.R. & BROOKS M.G. (1984): "Development and Evaluation of a Gas Chromatographic Method for the Determination of Triazine Herbicides in Natural Water Samples", *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **17**, 97-11.

UNICHIM (1988): "Metodo di analisi di residui di Atrazina e simili e di Molinate nelle acque potabili", in: *Atti del Convegno sulle Acque per Uso Potabile*, Milano, 214-218.

VIETTI L. et al. (1986): "Proposta di metodo multiresidui per la determinazione di pesticidi nelle acque potabili", *Boll. Chim. Igien.*, **37**, 359-365.

APPENDICE

Il presente metodo può essere applicato per la determinazione in acqua mediante GC-NPD, GC-ECD e GC-MS SIM delle sostanze attive riportate in Tab. 7, che rappresentano un discreto numero dei più comuni insetticidi, erbicidi, fungicidi ed acaricidi. Le condizioni gascromatografiche devono essere adeguate ai composti che si vogliono determinare. In Tab. 7, per ogni sostanza, sono riportate le sensibilità nei confronti dei rivelatori selettivi ed indicati gli ioni più significativi per l'analisi mediante spettrometria di massa.

In Fig. 7 si riporta anche un cromatogramma esemplificativo, riguardante un'ampia gamma di sostanze attive, compresi gli erbicidi azotati, ottenuto mediante analisi in gascromatografia con rivelazione di massa (GC/MS).

Tabella 7: Sensibilità ai rivelatori selettivi e ioni più significativi (per l'analisi in GC/MS) di alcuni antiparassitari

Sostanza attiva	CAS	Formula	P.M.	Rivelatore			ioni			
				NPD	ECD	MS				
Alaclor	15972-60-8	$C_{14}H_{20}ClNO_2$	269	X	X	X	160	188	146	238
Aldrin	309-00-2	$C_{12}H_8Cl_6$	362	O	X	X	66	261	263	265
Alfametrina	67375-30-8	$C_{22}H_{19}Cl_2NO_3$	415	X	X	X	163	165	181	209
Ametrina	834-12-8	$C_9H_{17}N_5S$	227	X	O	X	227	212	170	185
Atrazina	1912-24-9	$C_8H_{14}ClN_5$	215	X	X	X	200	202	215	217
Azinfos-Etile	2642-71-9	$C_{12}H_{16}N_3O_3PS_2$	345	X	X	X	132	160	77	105
Azinfos-Metile	86-50-0	$C_{10}H_{12}N_3O_3PS_2$	317	X	X	X	77	160	132	105
Benalaxil	71626-11-4	$C_{20}H_{23}NO_3$	325	X	O	X	148	206	204	176
Benfluralin	1861-40-1	$C_{13}H_{16}F_3N_3O_4$	335	X	X	X	292	264	145	318
Benzoilprop Etile	22212-55-1	$C_{18}H_{17}Cl_2NO_3$	365	X	X	X	105	77	292	
Bitertanolo	55179-31-2	$C_{20}H_{23}N_3O_2$	337	X	X	X	170	168	171	112
Bromofos-Etile	4824-78-6	$C_{10}H_{12}BrCl_2O_3PS$	392	X	X	X	357	359	301	303
Bromofos-Metile	2104-96-3	$C_8H_8BrCl_2O_3PS$	364	X	X	X	329	331	333	125
Bromopropilato	18181-80-1	$C_{17}H_{16}Br_2O_3$	426	O	X	X	339	341	183	185
Carbofenotion	786-19-6	$C_{11}H_{16}ClO_2PS_3$	342	X	X	X	157	159	121	153
Carbofuran	1563-66-2	$C_{12}H_{15}NO_3$	221	X	X	X	164	149	122	121
Cianazina	21725-46-2	$C_9H_{13}ClN_6$	240	X	X	X	225	227	172	198
Cicloate	1134-23-2	$C_{11}H_{21}NOS$	215	X	O	X	83	154	215	
Clorfenson	80-33-1	$C_{12}H_8Cl_2O_3S$	302	O	X	X	175	177	111	113
Clorfenvinfos	470-90-6	$C_{12}H_{14}Cl_3O_4P$	358	X	X	X	267	269	323	325
Clorotalonil	1897-45-6	$C_8Cl_4N_2$	264	X	X	X	264	266	268	133
Clorpirifos	2921-88-2	$C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$	349	X	X	X	197	199	314	316
Clorpirifos-Metile	5598-13-0	$C_7H_7Cl_3NO_3PS$	321	X	X	X	286	288	125	109
Clorprofam	101-21-3	$C_{10}H_{12}ClNO_2$	213	X	X	X	127	129	213	215
Clortal Dimetile	1861-32-1	$C_{10}H_6Cl_4O_4$	330	O	X	X	299	301	303	332
Clortoluron	15545-48-9	$C_{10}H_{13}ClN_2O$	212	X	X	X	72	212	214	
DDD op'	53-19-0	$C_{14}H_{10}Cl_4$	318	O	X	X	235	237	165	199
DDD pp'	72-54-8	$C_{14}H_{10}Cl_4$	318	O	X	X	235	237	165	199
DDE op'	3424-82-6	$C_{14}H_8Cl_4$	316	O	X	X	246	248	316	318
DDE pp'	72-55-9	$C_{14}H_8Cl_4$	316	O	X	X	246	248	316	318
DDT op'	784-02-6	$C_{14}H_9Cl_5$	352	O	X	X	235	237	165	199
DDT pp'	50-29-3	$C_{14}H_9Cl_5$	352	O	X	X	235	237	165	199
Diazinone	333-41-5	$C_{12}H_{21}N_2O_3PS$	304	X	X	X	179	137	152	304
Diclobenil	1194-65-6	$C_7H_3Cl_2N$	171	X	X	X	171	173	100	136
Diclofluanide	1085-98-9	$C_9H_{11}Cl_2FN_2O_2S_2$	332	X	X	X	123	167	224	226
Dieldrin	60-57-1	$C_{12}H_8Cl_6O$	378	O	X	X	79	263	277	237
Dimetaclor	50563-36-5	$C_{13}H_{18}ClNO_2$	255	X	X	X	134	197	199	
Dinitramina	29091-05-2	$C_{11}H_{13}F_3N_4O_4$	322	X	X	X	305	307	261	232
Endosulfan alfa	959-98-7	$C_9H_6Cl_6O_3S$	404	O	X	X	195	237	239	241
Endosulfan Beta	33213-65-3	$C_9H_6Cl_6O_3S$	404	O	X	X	195	237	239	241
Endosulfan Solfato	1031-07-8	$C_9H_6Cl_6O_4S$	420	O	X	X	270	272	274	237
Endrin	72-20-8	$C_{12}H_8Cl_6O$	378	O	X	X	261	263	265	243
Eptacloro	76-44-8	$C_{10}H_5Cl_7$	370	O	X	X	100	270	272	274
Eptenofos	23560-59-0	$C_9H_{12}ClO_4P$	250	X	X	X	124	126	89	215

segue

segue

Sostanza attiva	CAS	Formula	P.M.	Rivelatore NPD	ECD	MS	ioni			
Esaconazolo	79983-71-4	$C_{14}H_{17}Cl_2N_3O$	313	X	X	X	83	214	216	231
Etion	563-12-2	$C_9H_{22}O_4P_2S_4$	384	X	X	X	97	231	153	125
Etoprofos	13194-48-4	$C_8H_{19}O_2PS_2$	242	X	X	X	158	97	126	200
Fenamifos	22224-92-6	$C_{13}H_{22}NO_3PS$	303	X	O	X	154	303	217	260
Fenarimol	60168-88-9	$C_{17}H_{12}Cl_2N_2O$	330	X	X	X	139	141	251	253
Fenclorfos	299-84-3	$C_8H_8Cl_3O_3PS$	320	X	X	X	285	287	125	109
Fenitrotion	122-14-5	$C_9H_{12}NO_5PS$	277	X	X	X	125	109	277	260
Fenson	80-38-6	$C_{12}H_9ClO_3S$	268	O	X	X	77	141	268	270
Fention	55-38-9	$C_{10}H_{15}O_3PS_2$	278	X	O	X	278	125	109	169
Fentoato	2597-03-7	$C_{12}H_{17}O_4PS_2$	320	X	X	X	274	125	121	93
Flamprop Isopropile	52756-22-6	$C_{19}H_{19}ClFNO_3$	363	X	X	X	105	77	276	
Fluvalinate	69409-94-5	$C_{26}H_{22}ClF_3N_2O_3$	502	X	X	X	250	252	209	181
Forate	298-02-2	$C_7H_{17}O_2PS_3$	260	X	X	X	75	121	97	93
Fosalone	2310-17-0	$C_{12}H_{15}ClNO_4PS_2$	367	X	X	X	182	184	121	97
Fosfamidone	13171-21-6	$C_{10}H_{19}ClNO_5P$	299	X	X	X	127	264	72	138
Fosmet	732-11-6	$C_{11}H_{12}NO_4PS_2$	317	X	X	X	160	161	104	76
Furalaxil	57646-30-7	$C_{17}H_{19}NO_4$	301	X	O	X	95	242	152	
Iprodione	36734-19-7	$C_{13}H_{13}Cl_2N_3O_3$	329	X	X	X	314	316	187	189
Isofenfos	25311-71-1	$C_{15}H_{24}NO_4PS$	345	X	X	X	213	121	185	255
Isopropalin	33820-53-0	$C_{15}H_{23}N_3O_4$	309	X	X	X	280	238	264	309
Lindano	58-89-9	$C_6H_6Cl_6$	288	O	X	X	181	183	217	219
Linuron	330-55-2	$C_9H_{10}Cl_2N_2O_2$	248	X	X	X	61	248	250	160
Malation	121-75-5	$C_{10}H_{19}O_6PS_2$	330	X	X	X	127	125	173	158
Metalaxil	57837-19-1	$C_{15}H_{21}NO_4$	279	X	O	X	206	160	192	132
Metazaclor	67129-08-2	$C_{14}H_{16}ClN_3O$	277	X	X	X	81	132	133	134
Metidation	950-37-8	$C_6H_{11}N_2O_4PS_3$	302	X	X	X	145	85	93	125
Metabenztiazuron	18691-97-9	$C_{10}H_{11}N_3OS$	221	X	O	X	164	135		
Metobromuron	3060-89-7	$C_9H_{11}BrN_2O_2$	258	X	X	X	61	258	260	170
Metolaclor	51218-45-2	$C_{15}H_{22}ClNO_2$	283	X	X	X	162	238	240	146
Metoprotrina	841-06-5	$C_{11}H_{21}N_5OS$	271	X	O	X	256	213	226	271
Miclobutanil	88671-89-0	$C_{15}H_{17}ClN_4$	288	X	X	X	179	181	150	152
Molinate	2212-67-1	$C_9H_{17}NOS$	187	X	O	X	126	55	83	187
Nitrotal Isopropile	10552-74-6	$C_{14}H_{17}NO_6$	295	X	X	X	236	194	212	254
Nuarimol	63284-71-9	$C_{17}H_{12}ClFN_2O$	314	X	X	X	235	237	314	316
Oxadiazon	19666-30-9	$C_{15}H_{18}Cl_2N_2O_3$	344	X	X	X	175	177	258	262
Oxadixil	77732-09-3	$C_{14}H_{18}N_2O_4$	278	X	X	X	163	132	233	118
Oxifluorfen	42874-03-3	$C_{15}H_{11}ClF_3NO_4$	361	X	X	X	252	361	363	300
Paration	56-38-2	$C_{10}H_{14}NO_5PS$	291	X	X	X	97	109	291	139
Paration-Metile	298-00-0	$C_8H_{10}NO_5PS$	264	X	X	X	109	125	263	93
Penconazolo	66246-88-6	$C_{13}H_{15}Cl_2N_3$	283	X	X	X	159	161	248	250
Pendimetalin	40487-42-1	$C_{13}H_{19}N_3O_4$	281	X	X	X	252	162	192	281
Permetrina	52645-53-1	$C_{21}H_{20}Cl_2O_3$	390	O	X	X	183	163	165	127
Pirazofos	13457-18-6	$C_{14}H_{20}N_3O_5PS$	373	X	X	X	221	232	237	373
Piridafention	119-12-0	$C_{14}H_{17}N_2O_4PS$	340	X	X	X	199	340	125	188
Pirimicarb	23103-98-2	$C_{11}H_{18}N_4O_2$	238	X	O	X	166	72	238	123
Pirimifos-Metile	29232-93-7	$C_{11}H_{20}N_3O_3PS$	305	X	X	X	290	276	305	233
Procimidone	32809-16-8	$C_{13}H_{11}Cl_2NO_2$	283	X	X	X	96	67	283	285
Procloraz	67747-09-5	$C_{15}H_{16}Cl_3N_3O_2$	375	X	X	X	144	130	145	102
Profam	122-42-9	$C_{10}H_{13}NO_2$	179	X	O	X	93	179	137	120

segue

segue

Sostanza attiva	CAS	Formula	P.M.	Rivelatore			ioni			
				NPD	ECD	MS				
Profenofos	41198-08-7	$C_{11}H_{15}BrClO_3PS$	372	X	X	X	206	208	139	339
Prometon	1610-18-0	$C_{10}H_{19}N_5O$	225	X	O	X	210	225	183	168
Prometrina	7287-19-6	$C_{10}H_{19}N_5S$	241	X	O	X	184	241	226	199
Propaclor	1918-16-7	$C_{11}H_{14}ClNO$	211	X	X	X	120	176	211	213
Propazina	139-40-2	$C_9H_{16}ClN_5$	229	X	X	X	214	216	229	231
Propiconazolo	60207-90-1	$C_{15}H_{17}Cl_2N_3O_2$	341	X	X	X	173	175	259	261
Propizamide	23950-58-5	$C_{12}H_{11}Cl_2NO$	255	X	X	X	173	175	255	257
Quinalfos	13593-03-8	$C_{12}H_{15}N_2O_3PS$	298	X	X	X	146	157	156	298
Secbumeton	26259-45-0	$C_{10}H_{19}N_5O$	225	X	O	X	196	169	225	210
Simazina	122-34-9	$C_7H_{12}ClN_5$	201	X	X	X	201	203	186	188
Terbufos	13071-79-9	$C_9H_{21}O_2PS_3$	288	X	X	X	231	153	288	186
Terbumeton	33693-04-8	$C_{10}H_{19}N_5O$	225	X	O	X	169	210	154	225
Terbutilazina	5915-41-3	$C_9H_{16}ClN_5$	229	X	X	X	214	216	173	175
Terbutilazina	Desetil	$C_7H_{12}ClN_5$	201	X	O	X	186	188	201	
Terbutrina	886-50-0	$C_{10}H_{19}N_5S$	241	X	O	X	185	226	170	241
Tetraclorvinfos	22248-79-9	$C_{10}H_9Cl_4O_4P$	364	X	X	X	329	331	333	109
Tetradifon	116-29-0	$C_{12}H_6Cl_4O_2S$	354	O	X	X	354	356	159	161
Tiocarbazil	36756-79-3	$C_{16}H_{25}NOS$	279	X	O	X	91	100	156	279
Tolclofos Metile	57018-04-9	$C_9H_{11}Cl_2O_3PS$	300	X	X	X	265	267	125	93
Triadimefon	43121-43-3	$C_{14}H_{16}ClN_3O_2$	293	X	X	X	57	208	210	128
Triadimenol	55219-65-3	$C_{14}H_{18}ClN_3O_2$	295	X	X	X	112	168	128	130
Triazofos	24017-47-8	$C_{12}H_{16}N_3O_3PS$	313	X	O	X	161	162	172	257
Trifluralin	1582-09-8	$C_{13}H_{16}F_3N_3O_4$	335	X	X	X	306	264	307	206
Vinclozolin	50471-44-8	$C_{12}H_9Cl_2NO_3$	285	X	X	X	212	214	285	287

PM: peso molecolare
O: non rilevato
X: rilevato
Ioni MS: masse di ioni caratteristici (m/z) per l'analisi in GC-MS SIM

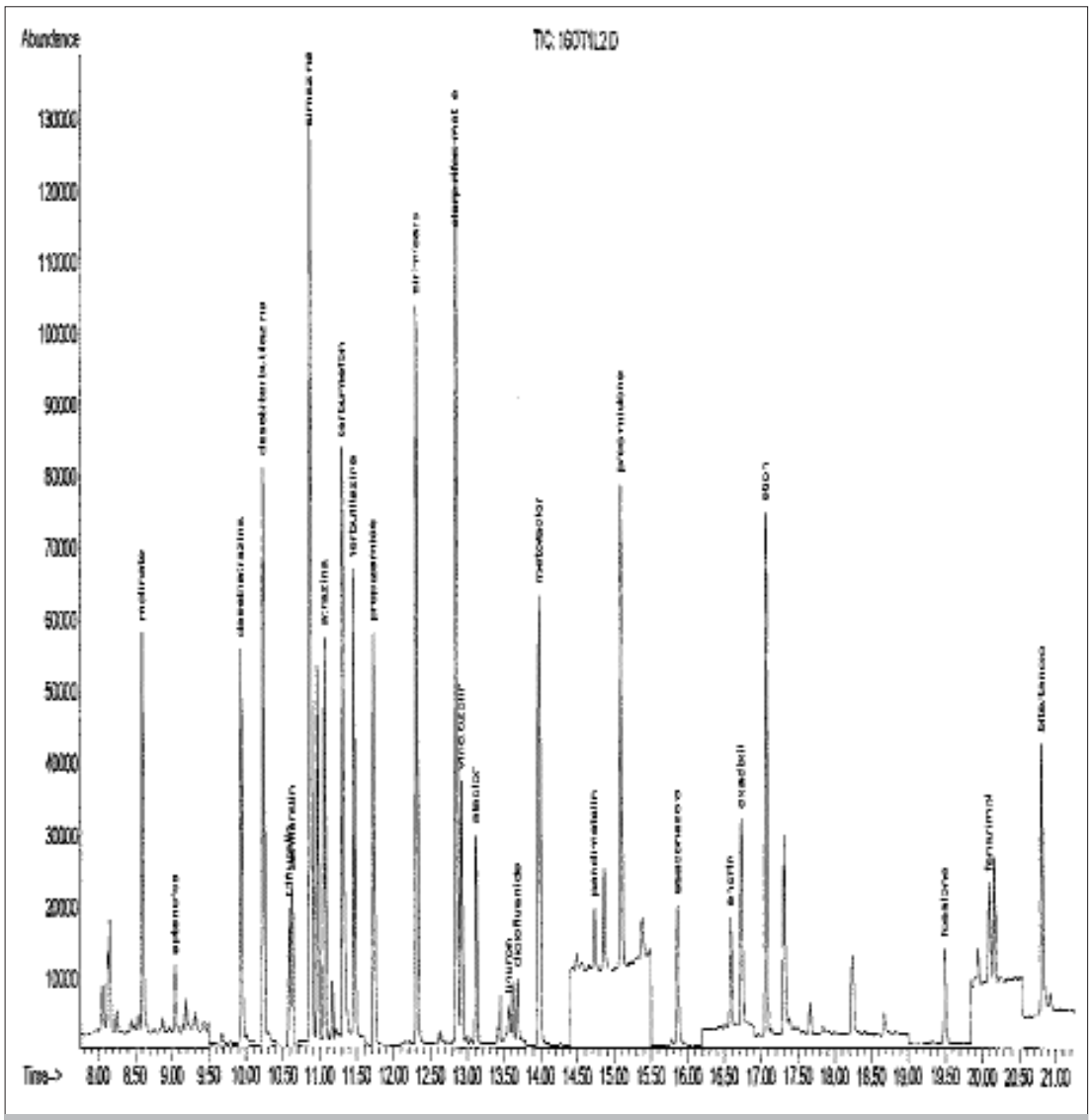


Figura 7: Cromatogramma CG/MS-SIM di un'estratto di acqua addizionata di prodotti fitosanitari (SPE C18; 500 mL a 0,5 mL) su colonna HP1-MS (l=30 m, d.i.=0,25 mm, spessore film=0,25 µm). Condizioni operative: 50°C per 1,1 min; 50→120°, 30°C/min; 120→285°, 8,4°C/min; 285°C per 4 min – "splitless" 1 minuto.

Tabella 8: Concentrazioni determinate e relativi ioni

Sostanza attiva	concentrazione (µg/L)	ioni acquisiti
molinate	0,11	126-55-187
eptenofos	0,12	124-126-89
desetilatrazina	0,17	172-174-187
desetilterbutilazina	0,17	186-188-201
trifluralin	0,12	306-264-335
benfluralin	0,12	292-264-293
simazina	0,16	201-203-186
atrazina	0,13	200-202-215
terbumeton	0,17	210-169-225
terbutilazina	0,12	214-216-229
propizamide	0,13	173-175-255
pirimicarb	0,14	166-72-238
clorpirifos metile	0,18	286-288-125
vinclozolin	0,15	212-214-285
alaclor	0,14	160-188-238
linuron	0,12	61-248-250
diclofluanide	0,14	123-224-226
metolaclor	0,16	162-238-240
pendimetalin	0,10	252-281-220
procimidone	0,14	283-285-96
esaconazolo	0,15	214-216-231
endrin	0,18	261-263-265
etion	riferimento interno	231-97-153
oxadixil	0,14	163-132-105
fosalone	0,12	182-184-367
fenarimol	0,11	139-141-251
bitertanolo	0,13	170-168-171

5070. Fenoli

I composti fenolici, per la loro diffusione, sono inquinanti di rilevante interesse ambientale, risultato di diverse attività industriali, agricole e dei processi di disinfezione con cloro di acque potabili e di scarico.
Composti fenolici sono presenti negli scarichi delle industrie della plastica, dei coloranti e delle cartiere. I cloro ed i nitro-fenoli sono i maggiori prodotti di degradazione degli erbicidi appartenenti alla classe dei fenossiacidi clorurati e degli organofosforati. Inoltre i fenoli possono derivare dalla biodegradazione di prodotti naturali quali gli acidi umici e la lignina.
In particolare, i clorofenoli sono pericolosi per la salute umana anche quando sono presenti nelle acque a basse concentrazioni.
Vengono descritti nel seguito due metodi, uno spettrofotometrico basato sulla reazione, preceduta, o meno, da estrazione con cloroformio, del gruppo idrossilico con 4-amminoantipirina (Metodi A1 e A2, rispettivamente), l'altro che impiega la cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC).
Il metodo spettrofotometrico soffre di notevoli limitazioni:

- non è adatto, per la sua scarsa sensibilità, alla determinazione di fenoli in tracce;
- come tutti i metodi aspecifici, è scarsamente accurato e tende generalmente a sovrastimare il contenuto di fenoli nel campione;
- non è in grado di distinguere fenoli con diversa tossicità e quindi risulta inadatto a valutare l'impatto di questi composti sull'ambiente.

Può essere impiegato, tuttavia, in valutazioni preliminari ("screening") sul contenuto di fenoli in un campione o per caratterizzare effluenti a composizione chimica nota.
Nonostante queste limitazioni, il metodo alla 4-amminoantipirina, tradizionalmente molto conosciuto, è inserito in numerosi protocolli per l'analisi dei fenoli, utilizzati in Italia e all'estero ed è indicato come metodo di riferimento in alcune normative nazionali (All. 2 del D.Lgs. 152/99, Sez. A, riguardante i criteri di classificazione delle acque superficiali destinate alla produzione di acqua potabile e Sez. B, criteri di classificazione delle acque idonee alla vita dei pesci).
Per questi motivi si è ritenuto opportuno mantenere detto metodo affiancando ad esso un metodo cromatografico (Metodo B) che consente di superare le limitazioni precedentemente indicate e di determinare singoli fenoli a livelli di tracce (µg/L).

METODI A – Determinazione spettrofotometrica

I metodi A1 e A2 consentono la determinazione dei fenoli distillabili (fenolo, fenoli orto e meta-sostituiti e alcuni para-sostituiti nei quali il sostituente può essere un carbossile, un alogeno, un metossile o un gruppo solfonico) che reagiscono con la 4-amminoantipirina.
I fenoli che presentano come sostituente in para un alchile, un arile, un gruppo benzoilico, un nitro gruppo, un gruppo nitroso, o un gruppo aldeidico, non vengono determinati con il presente metodo. Un tipico esempio di composto, appartenente a questa seconda categoria, è il para-cresolo (4-metilfenolo) che può essere presente in acque di scarico industriali.

METODO A1 - Determinazione spettrofotometrica mediante 4-amminoantipirina previa estrazione con cloroformio

1. Principio del metodo

I fenoli (fenolo, cresoli, xilenoli e relativi omologhi e derivati separabili mediante distillazione in ambiente acido) nelle acque naturali e di scarico vengono determinati mediante un metodo spettrofotometrico basato sulla formazione nella soluzione acquosa, a pH=10±0,2, di un composto colorato in giallo per reazione con la 4-amminoantipirina in presenza di esacianoferrato (III). Il composto viene estratto con cloroformio e l'assorbanza misurata alla lunghezza d'onda di 460 nm. La sensibilità del metodo e l'intensità del colore del composto colorato non sono le stesse per composti fenolici diversi. La concentrazione di composti fenolici nel campione viene espressa come mg/L di fenolo (C_6H_5OH).

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ad acque naturali e di scarico nell'intervallo di concentrazione 0,005-0,1 mg/L.

3. Interferenze e cause di errore

3.1 Sostanze chimiche ossidanti

Il cloro o altri ossidanti, rivelabili per aggiunta di ioduro di potassio, acidificazione e conseguente liberazione di iodio, possono essere distrutti aggiungendo una soluzione di solfato di ferro (II) o di arsenito di sodio. L'eventuale eccesso di questi reattivi non interferisce nel dosaggio dei fenoli in quanto il campione viene successivamente sottoposto a distillazione. La rimozione delle sostanze ossidanti deve avvenire immediatamente dopo il campionamento, altrimenti si corre il rischio che i composti fenolici, ossidati rapidamente, in parte o totalmente, vengano determinati in difetto.

3.2 Oli e catrami

Molti composti di natura fenolica possono essere sottratti alla determinazione in quanto si sciolgono in oli e catrami, che, se presenti, vanno eliminati mediante estrazione selettiva con tetracloruro di carbonio in ambiente fortemente basico. In queste condizioni non vengono estratti i fenoli.
In pratica si porta il pH dell'acqua in esame a 12,0÷12,5 mediante aggiunta di idrossido di sodio in pasticche e si effettua l'estrazione; successivamente si elimina ogni traccia di tetracloruro di carbonio mediante leggero riscaldamento su bagno termostatico.

3.3 Composti solforati

I composti che per acidificazione liberano idrogeno solforato (H_2S) o biossido di zolfo (SO_2) possono interferire nella determinazione dei fenoli; per eliminare queste interferenze, si acidifica il campione con acido fosforico fino a viraggio del metilarancio, quindi si aggiunge una quantità di solfato di rame ($CuSO_4$) sufficiente ad impartire un leggero colore blu al campione o finchè non si osservi più formazione di precipitato (CuS). L'eccesso di H_2S o SO_2 può essere rimosso aerando il campione per 5-10 minuti sotto agitazione.

4. Campionamento e conservazione del campione

Per il campionamento e la conservazione del campione bisogna operare secondo quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". Poiché i composti fenolici in acqua possono essere facilmente ossidati, occorre procedere rapidamente all'analisi del campione. Le interferenze, dovute alla biodegradazione operata da specifici batteri presenti nelle acque, che possono tradursi in diminuzione della quantità dei fenoli da determinare, possono essere contenute conservando il campione a temperatura intorno a 4°C od eliminate per cauta acidificazione del campione con acido solforico concentrato fino a pH<2.

5. Apparecchiature

Attrezzatura di uso comune di laboratorio.

5.1 Apparecchio di distillazione in vetro, con giunti smerigliati, costituito da un pallone da distillazione a collo lungo avente capacità di 1 L, collegato ad un refrigerante e matraccio di raccolta del distillato.

5.2 Spettrofotometro dotato di celle con cammino ottico da 1-10 cm.

6. Reattivi

6.1 Soluzione di 4-amminoantipirina al 2%

Sciogliere 2,0 g di 4-amminoantipirina in acqua distillata e diluire a 100 mL. Questa soluzione va preparata giornalmente.

6.2 Soluzione di cloruro di ammonio al 2%

Sciogliere 20 g di cloruro di ammonio (NH_4Cl) in acqua distillata e diluire a 1000 mL.

6.3 Soluzione concentrata di ammoniaca (d=0,90)

6.4 Cloroformio

6.5 Diclorometano

6.6 Soluzione di metilarancio allo 0,1 %

Sciogliere 0,1 g di metilarancio in 100 mL di acqua distillata.

6.7 Acido solforico concentrato (96%) (d=1,84)

6.8 Acido solforico diluito 1 + 1

Aggiungere cautamente 100 mL di acido solforico concentrato (6.7) a 100 mL di acqua sotto continua agitazione. Raffreddare a temperatura ambiente prima dell'uso.

6.9 Acido fosforico concentrato (85%)

6.10 Soluzione di acido fosforico (1+9)

Miscelare 10 mL di acido fosforico (6.9) con 90 mL di acqua distillata.

6.11 Idrossido di sodio in pasticche

6.12 Soluzione di idrossido di sodio al 10%

Sciogliere 10 g di idrossido di sodio (6.11) in acqua distillata e diluire a 100 mL.

6.13 Cloruro di sodio

6.14 Soluzione di esacianoferrato (III) di potassio all'8%

Sciogliere 8 g di esacianoferrato (III) di potassio ($K_3Fe(CN)_6$) in acqua distillata e diluire a 100 mL. Se necessario, filtrare e conservare in bottiglia di vetro scura. Questa soluzione è stabile per una settimana.

6.15 Soluzione di solfato di rame (100 g/L)

Sciogliere 100 g di solfato di rame $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ in acqua distillata e diluire a 1000 mL.

6.16 Soluzione concentrata di fenolo (1000 mg/L) (1 mL=1 mg)

Sciogliere 100 mg di fenolo (C_6H_5OH) puro in acqua distillata precedentemente bollita e raffreddata e portare a 100 mL con la stessa acqua. La soluzione si può usare per un mese.

6.17 Soluzione diluita di fenolo (10 mg/L) (1 mL=0,01 mg)

Introdurre 2,5 mL di soluzione concentrata in un matraccio tarato da 250 mL e portare a volume con acqua distillata trattata come in (6.16). Questa soluzione va preparata giornalmente.

6.18 Solfato di sodio anidro

7. Procedimento

Se necessario, effettuare preliminarmente i trattamenti previsti per l'eliminazione delle sostanze interferenti descritti al Capitolo 3.
Prelevare poi 500 mL di campione. Portare la soluzione a pH=4 circa con acido fosforico diluito (6.10) usando come indicatore il metilarancio (6.6) oppure un pHmetro. Se il campione e stato conservato con aggiunta di acido solforico come indicato al Capitolo 4, omettere l'aggiunta di acido fosforico e portare la soluzione a pH=4 circa con idrossido di sodio al 10% (6.12). Aggiungere 5 mL della soluzione di solfato di rame (6.15).

7.1 Distillazione

Trasferire la soluzione nel pallone di distillazione (5.1) e distillare fino a raccogliere circa 450 mL di distillato in pallone tarato da 500 mL.
Interrompere la distillazione e, quando cessa l'ebollizione, aggiungere altri 50 mL di acqua distillata calda nel pallone di distillazione (5.1). Riprendere la distillazione fino a raccogliere un volume di 500 mL.
Qualora il distillato fosse torbido, sottoporlo a nuova distillazione, operando con le stesse modalità di prima; nel caso in cui il distillato risultasse ancora torbido è necessario ricorrere al procedimento descritto al punto successivo.

7.2 Trattamento di distillati torbidi

A 500 mL del campione originale aggiungere 4 gocce di indicatore metilarancio (6.6) e una quantità di acido solforico (6.8) fino al viraggio; trasferire la soluzione in un imbuto separato-

re ed aggiungere 150 g di cloruro di sodio (6.13). Estrarre con cinque successive porzioni di cloroformio (6.4), impiegando la prima volta 40 mL di solvente e 25 mL le altre successive.
Trasferire l'estratto cloroformico in un secondo imbuto separatore ed agitare con tre successive aggiunte di soluzione di idrossido di sodio (6.12), impiegando un volume di 4 mL per la prima volta e 3 mL per le due successive.
Riunire gli estratti alcalini in un beaker, riscaldare su un bagno ad acqua fino a rimozione completa del cloroformio, quindi raffreddare e diluire a 500 mL con acqua distillata.
Procedere con la distillazione come descritto in (7.1).

Nota: *si può usare il diclorometano (6.5) al posto del cloroformio, specialmente se si forma un'emulsione stabile durante l'estrazione della soluzione cloroformica con idrossido di sodio.*

7.3 Taratura

Prendere 5 beaker da 1000 mL ed in ognuno di essi versare 500 mL di acqua distillata. Uno di questi fungerà da bianco mentre negli altri quattro aggiungere, con pipetta tarata, rispettivamente, 0,5 mL, 1,0 mL, 2,0 mL e 5,0 mL di soluzione di riferimento di fenolo (6.17) ed agitare.
Aggiungere 25 mL di soluzione di cloruro di ammonio (6.2) e portare le soluzioni a pH= 10,0 ±0,2 con la soluzione di ammoniaca (6.3).
Trasferire ciascuna soluzione in un imbuto separatore da 1000 mL ed aggiungere 3 mL di soluzione di 4-amminoantipirina (6.1) agitando immediatamente.
Aggiungere a ciascuna soluzione 3 mL di soluzione di esacianoferrato (III) di potassio (6.14) agitando immediatamente ed attendere 5 minuti per lo sviluppo del colore. Le soluzioni dovrebbero essere chiare, leggermente colorate in giallo. In caso contrario, sono presenti sostanze interferenti che vanno rimosse.
Ad ogni imbuto separatore aggiungere esattamente 25 mL di cloroformio (6.4) ed agitare per alcuni minuti.
Attendere la separazione delle fasi e filtrare la fase organica attraverso uno strato di solfato di sodio anidro (6.18) posto su lana di vetro, raccogliendola direttamente nelle celle di misura.
Effettuare le letture spettrofotometriche alla lunghezza d'onda di 460 nm, usando celle da 1-5 cm e azzerando lo strumento con il bianco. Qualora si utilizzino celle da 10 cm dovranno essere impiegati aliquote di 50 mL di cloroformio per l'estrazione. Costruire la curva di taratura riportando in ascisse le concentrazioni di fenolo espresse in mg/L e in ordinate i valori di assorbanza delle soluzioni corrispondenti.

7.4 Determinazione preliminare dei composti fenolici

Trasferire 500 mL di distillato in un beaker da 1 L ed operare come descritto per la costruzione della curva di taratura (7.3).

7.5 Determinazione dei composti fenolici

Operare come descritto in (7.3) per le soluzioni di riferimento. Se la determinazione preliminare (7.4) ha fornito un valore compreso nella curva di taratura questo può essere utilizzato direttamente senza effettuare ulteriori misure.
Se invece la determinazione preliminare (7.4) ha indicato una concentrazione di fenoli superiore a 0,1 mg/L si può seguire il metodo A2 (determinazione spettrofotometrica diretta con 4-amminoantipirina).

8. Calcoli

La concentrazione dei fenoli nel campione, espressa come milligrammi/litro di fenolo, è data da:

$$C = \frac{a \cdot V_1}{V_2}$$

dove:
C = concentrazione (mg/L) di fenoli;
a = concentrazione (mg/L) di fenoli ricavata dalla curva di taratura;
V_1 = volume (mL) utilizzato per la curva di taratura;
V_2 = volume (mL) utilizzato per la determinazione.

9. Qualità del dato

Prove effettuate (n=5) da sei laboratori su soluzioni sintetiche di acqua deionizzata aventi una concentrazione in fenoli di 0,09 mg/L hanno fornito un coefficiente di variazione [CV(%) = (scarto tipo/valore medio)·100] del 5%.
L'accuratezza del metodo dipende, oltre che dalle sostanze interferenti, dai coefficienti di estinzione dei fenoli presenti.

METODO A2 - Determinazione spettrofotometrica diretta mediante 4-amminoantipirina

1. Principio del metodo

I fenoli (fenolo, cresoli, xilenoli e relativi omologhi e derivati separabili mediante distillazione in ambiente acido) nelle acque naturali e di scarico vengono determinati mediante un metodo spettrofotometrico basato sulla formazione nella soluzione acquosa, a pH=10±0,2, di un composto colorato in giallo per reazione con la 4-amminoantipirina in presenza di esacianoferrato (III). L'assorbanza del composto viene misurata alla lunghezza d'onda di 510 nm. La sensibilità del metodo e l'intensità del colore del composto colorato non sono le stesse per composti fenolici diversi. La concentrazione di composti fenolici nel campione viene espressa come mg/L di fenolo (C_6H_5OH).

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ad acque naturali e di scarico nell'intervallo di concentrazione 0,1-5 mg/L.

3. Interferenze e cause di errore

3.1 Sostanze chimiche ossidanti

Il cloro o altri ossidanti, rivelabili per aggiunta di ioduro di potassio, acidificazione e conseguente liberazione di iodio, possono essere distrutti aggiungendo una soluzione di solfato di ferro (II) o di arsenito di sodio. L'eventuale eccesso di questi reattivi non interferisce nel dosaggio dei fenoli in quanto il campione viene successivamente sottoposto a distillazione. La rimozione delle sostanze ossidanti deve avvenire immediatamente dopo il campionamento, altrimenti si corre il rischio che i composti fenolici, ossidati rapidamente, in parte o totalmente, vengano determinati in difetto.

3.2 Oli e catrami

Molti composti di natura fenolica possono essere sottratti alla determinazione in quanto si sciolgono in oli e catrami, che, se presenti, vanno eliminati mediante estrazione selettiva con

tetracloruro di carbonio in ambiente fortemente basico. In queste condizioni non vengono estratti i fenoli.
In pratica si porta il pH dell'acqua in esame a 12,0÷12,5 mediante aggiunta di idrossido di sodio in pasticche e si effettua l'estrazione; successivamente si elimina ogni traccia di tetracloruro di carbonio mediante leggero riscaldamento su bagno termostatico.

3.3 Composti solforati

I composti che per acidificazione liberano idrogeno solforato (H_2S) o biossido di zolfo (SO_2) possono interferire nella determinazione dei fenoli; per eliminare queste interferenze, si acidifica il campione con acido fosforico fino a viraggio del metilarancio, quindi si aggiunge una quantità di solfato di rame ($CuSO_4$) sufficiente ad impartire un leggero colore blu al campione o finchè non si osservi più formazione di precipitato (CuS). L'eccesso di H_2S o SO_2 può essere rimosso aerando il campione per 5-10 minuti sotto agitazione.

4. Campionamento e conservazione del campione

Per il campionamento e la conservazione del campione bisogna operare secondo quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". Poichè i composti fenolici in acqua possono essere facilmente ossidati, occorre procedere rapidamente all'analisi del campione. Le interferenze, dovute alla biodegradazione operata da specifici batteri presenti nelle acque, che possono tradursi in diminuzione della quantità dei fenoli da determinare, possono essere contenute conservando il campione a temperatura intorno a 4°C od eliminate per cauta acidificazione del campione con acido solforico concentrato fino a pH<2.

5. Apparecchiature

Attrezzatura di uso comune di laboratorio.

5.1 Apparecchio di distillazione in vetro, con giunti smerigliati, costituito da un pallone da distillazione a collo lungo avente capacità di 1 L, collegato ad un refrigerante e matraccio di raccolta del distillato.

5.2 Spettrofotometro dotato di celle con cammino ottico da 1 cm.

6. Reattivi

6.1 Soluzione di 4-amminoantipirina al 2%

Sciogliere 2,0 g di 4-amminoantipirina in acqua distillata e diluire a 100 mL. Questa soluzione va preparata giornalmente.

6.2 Soluzione di cloruro di ammonio al 2%

Sciogliere 20 g di cloruro di ammonio (NH_4Cl) in acqua distillata e diluire a 1000 mL.

6.3 Soluzione concentrata di ammoniaca (d=0,90)

6.4 Cloroformio

6.5 Diclorometano

6.6 Soluzione di metilarancio allo 0,1%

Sciogliere 0,1 g di metilarancio in 100 mL di acqua distillata.

6.7 Acido solforico concentrato (96%) (d=1,84)

6.8 Acido solforico diluito 1+1

Aggiungere cautamente 100 mL di acido solforico concentrato (6.7) a 100 mL di acqua sotto continua agitazione. Raffreddare a temperatura ambiente prima dell'uso.

6.9 Acido fosforico concentrato (85%)

6.10 Soluzione di acido fosforico (1+9)

Miscelare 10 mL di acido fosforico (6.9) con 90 mL di acqua distillata.

6.11 Idrossido di sodio in pasticche

6.12 Soluzione di idrossido di sodio al 10%

Sciogliere 10 g di idrossido di sodio (6.11) in acqua distillata e diluire a 100 mL.

6.13 Cloruro di sodio

6.14 Soluzione di esacianoferrato (III) di potassio all '8%

Sciogliere 8 g di esacianoferrato (III) di potassio ($K_3Fe(CN)_6$) in acqua distillata e diluire a 100 mL. Se necessario, filtrare e conservare in bottiglia di vetro scura. Questa soluzione è stabile per una settimana.

6.15 Soluzione di solfato di rame (100 g/L)

Sciogliere 100 g di solfato di rame $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ in acqua distillata e diluire a 1000 mL.

6.16 Soluzione concentrata di fenolo (1000 mg/L) (1 mL=1 mg)

Sciogliere 100 mg di fenolo (C_6H_5OH) puro in acqua distillata precedentemente bollita e raffreddata e portare a 100 mL con la stessa acqua. La soluzione si può usare per un mese.

6.17 Soluzione diluita di fenolo (10 mg/L) (1 mL=0,01 mg)

Introdurre 2,5 mL di soluzione concentrata in un matraccio tarato da 250 mL e portare a volume con acqua distillata trattata come in (6.16). Questa soluzione va preparata giornalmente.

6.18 Solfato di sodio anidro

7. Procedimento

Se necessario, effettuare preliminarmente i trattamenti previsti per l'eliminazione delle sostanze interferenti descritti al Capitolo 3.
Prelevare poi 500 mL di campione. Portare la soluzione a pH=4 circa con acido fosforico diluito (6.10) usando come indicatore il metilarancio (6.6) oppure un pHmetro. Se il campione è stato conservato con aggiunta di acido solforico come indicato al Capitolo 4, omettere l'ag-

giunta di acido fosforico e portare la soluzione a pH=4 circa con idrossido di sodio al 10% (6.12). Aggiungere 5 mL della soluzione di solfato di rame (6.15).

7.1 Distillazione

Trasferire la soluzione nel pallone di distillazione (5.1) e distillare fino a raccogliere circa 450 mL di distillato in pallone tarato da 500 mL.
Interrompere la distillazione e, quando cessa l'ebollizione, aggiungere altri 50 mL di acqua distillata calda nel pallone di distillazione (5.1). Riprendere la distillazione fino a raccogliere un volume di 500 mL.
Qualora il distillato fosse torbido, sottoporlo a nuova distillazione, operando con le stesse modalità di prima; nel caso in cui il distillato risultasse ancora torbido è necessario ricorrere al procedimento descritto al punto successivo.

7.2 Trattamento di distillati torbidi

A 500 mL del campione originale aggiungere 4 gocce di indicatore metilarancio (6.6) e una quantità di acido solforico (6.8) fino al viraggio; trasferire la soluzione in un imbuto separatore ed aggiungere 150 g di cloruro di sodio (6.13). Estrarre con cinque successive porzioni di cloroformio (6.4), impiegando la prima volta 40 mL di solvente e 25 mL le altre successive.
Trasferire l'estratto cloroformico in un secondo imbuto separatore ed agitare con tre successive aggiunte di soluzione di idrossido di sodio (6.12), impiegando un volume di 4 mL per la prima volta e 3 mL per le due successive.
Riunire gli estratti alcalini in un beaker, riscaldare su un bagno ad acqua fino a rimozione completa del cloroformio, quindi raffreddare e diluire a 500 mL con acqua distillata.
Procedere con la distillazione come descritto in 7.1.

NOTA: *si può usare il diclorometano (6.5) al posto del cloroformio, specialmente se si forma un'emulsione stabile durante l'estrazione della soluzione cloroformica con idrossido di sodio.*

7.3 Curva di taratura

Introdurre con pipetta tarata rispettivamente, 1 mL, 5 mL, 10 mL e 50 mL di soluzione di riferimento di fenolo (6.17) in matracci tarati da 100 mL e diluire con acqua distillata a circa 75 mL. In un altro matraccio tarato da 100 mL, che fungerà da bianco, porre 75 mL di acqua distillata.
Aggiungere in ciascun matraccio tarato 5 mL di soluzione di cloruro d'ammonio (6.2) e portare la soluzione a pH (10,0±0,2) con soluzione di ammoniaca (6.3).
Aggiungere 2 mL della soluzione di 4-amminoantipirina (6.1) a ciascuna soluzione e agitare.
Aggiungere 2 mL di soluzione di esacianoferrato (III) di potassio (6.14), agitare immediatamente e portare a volume a 100 mL con acqua distillata.
Dopo 15 minuti effettuare le letture allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 510 nm usando celle da 1 cm e azzerando ogni volta lo strumento con il bianco.
Costruire la curva di taratura riportando le letture ottenute su un grafico avente in ascisse le concentrazioni di fenolo espresse in mg/L e in ordinate i valori di assorbanza delle soluzioni corrispondenti.

7.4 Determinazione preliminare dei composti fenolici

Trasferire in un beaker 100 mL di distillato ed operare come descritto per la costruzione della curva di taratura (7.3).

7.5 Determinazione dei composti fenolici

Operare come descritto in (7.3) per le soluzioni di taratura. Se la determinazione prelimina-

re (7.4) ha fornito un valore compreso nella curva di taratura questo può essere utilizzato direttamente senza effettuare ulteriori misure.
Se invece la determinazione preliminare (7.4) ha indicato una concentrazione di fenoli superiore a 5 mg/L occorre stabilire il volume di distillato (7.1) da impiegare per la determinazione. Per conoscere detto volume effettuare diluizioni successive della soluzione acquosa fino a che la lettura rientri nell'intervallo della curva di taratura. Una volta trovato il rapporto di diluizione ottimale risalire al volume di distillato da impiegare nell'analisi e procedere all'esecuzione del metodo operando come descritto in (7.3).

8. Calcoli

La concentrazione dei fenoli nel campione, espressa come milligrammi/litro di fenolo, è data da:

$$C = \frac{a \cdot V_1}{V_2}$$

dove:
C = concentrazione (mg/L) di fenoli;
a = concentrazione (mg/L) di fenoli ricavata dalla curva di taratura;
V_1 = volume (mL) utilizzato per la curva di taratura;
V_2 = volume (mL) utilizzato per la determinazione.

9. Qualità del dato

Prove effettuate (n=5) da sei laboratori su soluzioni sintetiche di acqua deionizzata aventi una concentrazione in fenoli di 4,7 mg/L hanno fornito un coefficiente di variazione [CV(%) = (scarto tipo/valore medio)·100] del 3,8%. Va tenuto presente che la precisione di un metodo generalmente peggiora all'aumentare della complessità della matrice.
L'accuratezza del metodo dipende, oltre che dalle sostanze interferenti, dai coefficienti di estinzione dei fenoli presenti.

METODO B – Determinazione mediante cromatografia liquida ad alta prestazione con rivelazione spettrofotometrica nell'ultravioletto (HPLC-UV)

1. Principio del metodo

Il metodo consiste in una estrazione liquido-liquido o liquido-solido, su cartucce SPE (solid phase extraction), dei fenoli contenuti nel campione acquoso. I fenoli contenuti nell'estratto organico concentrato vengono separati e rilevati mediante cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) accoppiata ad una rivelazione spettrofotometrica nell'ultravioletto (UV).
L'analisi qualitativa dei singoli fenoli è basata sul confronto dei tempi di ritenzione dei picchi ottenuti nel cromatogramma HPLC-UV del campione con quelli ottenuti da idonee soluzioni di riferimento. La determinazione quantitativa dei vari fenoli viene effettuata con le aree dei rispettivi picchi cromatografici sulla base di opportune rette di taratura di soluzioni di riferimento. Per una migliore accuratezza del metodo si può utilizzare come riferimento interno, aggiunto nel campione acquoso, il 4-fluorofenolo. I risultati sono di norma espressi in µg/L per ciascun fenolo.

Tabella 1: Fenoli analizzabili con il presente metodo

	Composto
1	Fenolo
2	4-nitrofenolo
3	2-clorofenolo
4	2,4-dinitrofenolo
5	2-nitrofenolo
6	2,4-dimetilfenolo
7	4-cloro-3-metilfenolo
8	2,4-diclorofenolo
9	4,6-dinitro-2-metilfenolo
10	2,4,6-triclorofenolo
11	pentaclorofenolo

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile alle acque superficiali, sotterranee e di scarico e consente la determinazione dei fenoli riportati in Tab. 1.
Per le acque superficiali, partendo da un campione di 1000 mL, il metodo consente di determinare ciascun analita ad una concentrazione di almeno 1 µg/L. Per le acque di scarico, partendo da un campione di 50 mL, il metodo consente di dosare gli analiti ad una concentrazione di 50 µg/L.

3. Interferenze e cause di errore

Normali interferenti possono essere quei composti organici che danno luogo, durante l'analisi cromatografica, a picchi con tempi di ritenzione coincidenti a quelli dei fenoli in esame. Solventi, reagenti, vetreria, contaminazione dell'ambiente di lavoro ed ogni trattamento del campione possono causare la presenza di picchi interferenti e/o alterazioni della corrente di fondo del rivelatore con conseguenti difficoltà d'interpretazione del tracciato cromatografico. Pertanto, al fine di essere sicuri che tutti i materiali utilizzati siano esenti da interferenze nelle condizioni operative adottate, è buona norma, sia all'inizio dell'indagine che periodicamente, sottoporre all'intera procedura uno o più "bianchi" sostituendo al campione acqua distillata. Nel caso di evidenza d'interferenze, individuarne la provenienza analizzando ogni singolo passaggio della procedura e procedere alla loro eliminazione. Può essere richiesta una specifica selezione dei reattivi ed una purificazione dei solventi mediante distillazione.
Oli e catrami, se presenti, vanno eliminati mediante estrazione selettiva con un solvente organico (tetracloruro di carbonio, esano, ecc.) in ambiente fortemente basico. In queste condizioni non vengono estratti i fenoli. Portare il pH dell'acqua in esame a 12,0÷12,5 mediante aggiunta di idrossido di sodio in pasticche ed effettuare l'estrazione; successivamente eliminare ogni traccia di tetracloruro di carbonio mediante leggero riscaldamento su bagno maria.

4. Campionamento e conservazione del campione

I campioni vengono prelevati in bottiglie di vetro neutro, possibilmente scuro, con chiusura a smeriglio oppure a vite con guarnizione di teflon. Poiché i composti fenolici in acqua possono essere facilmente ossidati, occorre procedere rapidamente all'analisi del campione, preferibilmente entro 48 ore dal prelievo. Le interferenze, dovute alla biodegradazione operata da specifici batteri presenti nelle acque, che possono tradursi in una diminuzione della quantità dei fenoli da determinare, possono essere limitate conservando il campione a temperatura intorno a 4°C od eliminate per cauta acidificazione del campione con acido solforico concentrato fino a pH<2.

5. Apparecchiature

5.1 Normale vetreria di laboratorio

Dopo il lavaggio e prima dell'uso, la vetreria deve essere sciacquata con acqua bidistillata, con acetone ed asciugata in stufa.

5.2 HPLC

Si consiglia l'uso di uno strumento dotato di rivelatore UV a lunghezza d'onda variabile o a serie di diodi (DAD) e di colonna a fase inversa. La fase mobile è costituita da una miscela di acetonitrile/acqua o metanolo/acqua tamponata a pH=3 mediante acido fosforico o acetico o formico o trifluoroacetico. L'analisi viene effettuata in gradiente la cui composizione e durata, così come il flusso di lavoro, dipende dal tipo e dalle dimensioni della colonna utilizzata.

5.3 Adsorbenti per estrazione SPE

Per l'estrazione liquido-solido si consiglia di utilizzare cartucce costituite da carbone grafitato o da materiale polimerico, con fase stazionaria polare o specifica per composti fenolici o da materiale siliceo con fase stazionaria C_{18} o C_8. In alternativa di possono utilizzare i dischi SPE. La quantità di materiale adsorbente dipenderà dalle cartucce utilizzate. La procedura di condizionamento, estrazione ed eluizione viene effettuata sotto vuoto montando la cartuccia su una beuta da vuoto o su un sistema per estrazione liquido-solido disponibile in commercio secondo le modalità consigliate dal produttore delle cartucce.
La presenza di particolato nel campione acquoso (acque superficiali, di scarico) può determinare un'ostruzione parziale o totale della cartuccia durante il procedimento di estrazione. Tale inconveniente può essere superato utilizzando filtri in fibra di vetro o polvere di vetro in linea al substrato adsorbente in modo tale da effettuare una preventiva filtrazione del campione o filtrando il campione su filtri in fibra di vetro, lavando il filtro con metanolo ed aggiungendo il metanolo raccolto al campione prima del passaggio sulla cartuccia.

5.4 Evaporatore rotante

6. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e l'acqua utilizzata deve essere esente da sostanze organiche.

6.1 Acetonitrile o metanolo (per HPLC)

6.2 Acido fosforico oppure acido acetico oppure acido formico oppure acido trifluoroacetico

6.3 Diclorometano

6.4 Tetrabutilammonio fluoruro (TBAF)

6.5 Carbonato di sodio (Na_2CO_3)

6.6 Soluzioni di riferimento di fenoli

6.6.1 Soluzioni concentrate di fenoli

Le soluzioni concentrate di fenoli si preparano pesando esattamente una quantità di circa 100 mg di ognuno dei fenoli di Tab. 1 e del riferimento interno, trasferendola in un matraccio tarato (100 mL) e portando a volume con acetonitrile. Queste soluzioni possono essere conservate a 4°C per un mese. Sono disponibili in commercio delle soluzioni di riferimento multicomponente di fenoli. Queste soluzioni, essendo vendute con certificato d'analisi, possono essere utilizzate in sostituzione della procedura sopra riportata.

6.6.2 Soluzioni diluite di fenoli

Le soluzioni diluite a concentrazione di circa 0,1-10 mg/L, contenenti il riferimento interno, se

utilizzato, ad una concentrazione compresa tra 1 e 10 mg/L, vengono ottenute per diluizioni successive delle soluzioni concentrate impiegando come solvente la fase mobile usata nell'analisi HPLC. È preferibile che tali soluzioni di riferimento siano preparate giornalmente.

7. Procedimento

7.1 Trattamento preliminare

Se il campione è stato refrigerato, prima dell'estrazione farlo riequilibrare a temperatura ambiente. Controllare l'eventuale presenza di particelle in sospensione ed agitare per consentire una migliore omogeneità. Se si utilizza il riferimento interno, aggiungere un volume idoneo di soluzione in maniera che la sua concentrazione, dopo la procedura di concentrazione, sia la stessa usata per le soluzioni diluite (6.6.2).

7.2 Estrazione

7.2.1 Estrazione liquido-liquido

Il campione (1 litro o 50 mL, rispettivamente per acque superficiali o di scarico), portato a pH=2 con acido solforico, viene estratto con due aliquote successive di diclorometano da 50 mL o 10 mL ciascuna, rispettivamente per un campione di acqua superficiale o di scarico. Anidrificare gli estratti riuniti con solfato di sodio anidro e portare a piccolo volume (circa 5 mL) con un rotoevaporatore, avendo cura di utilizzare un vuoto moderato (40-50 mmHg) ed una temperatura del bagno termostatato non superiore ai 30°C. Questo stadio è particolarmente critico in quanto è stata evidenziata la perdita dei fenoli più volatili quando è stato usato un vuoto più spinto ed una temperatura più elevata. Portare a secco con un moderato flusso di azoto e riprendere con 0,5 mL della fase mobile di partenza del gradiente cromatografico. Per evitare la perdita dei fenoli più volatili si possono utilizzare alcuni accorgimenti descritti nel Sottoparagrafo 7.2.4. L'estratto ottenuto viene analizzato mediante HPLC-UV.
La Fig. 1 mostra una tipica separazione di fenoli con questa procedura.

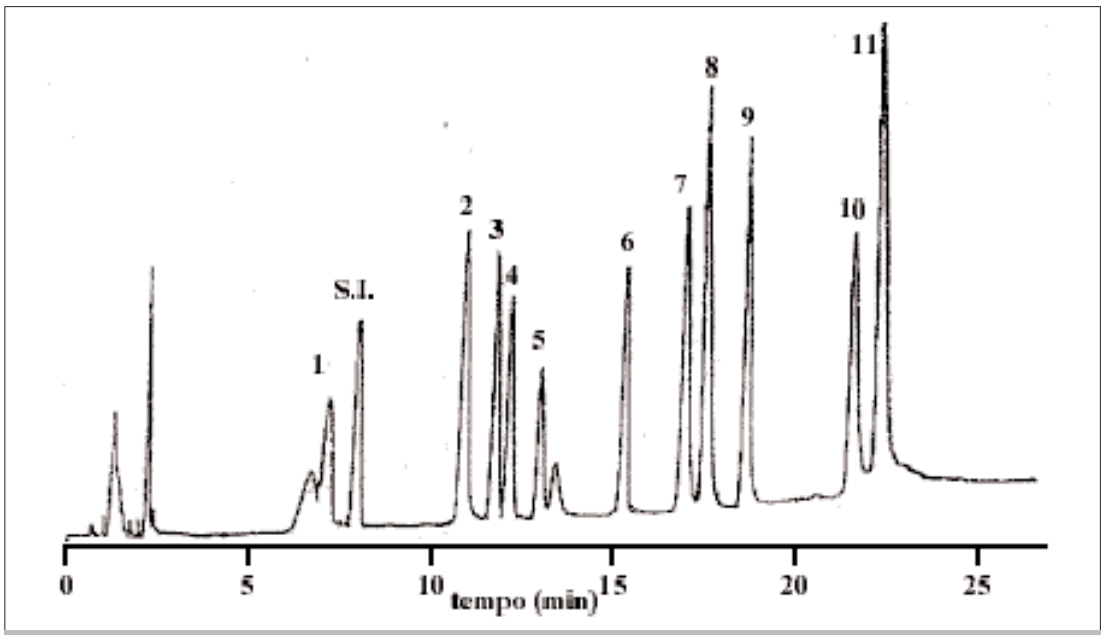


Figura 1: Cromatogramma ottenuto a 220 nm di un campione di acqua superficiale contaminato con 10 ppb di ciascun composto fenolico di Tab. 1, estratto con tecnica liquido/liquido. Condizioni analitiche: colonna cromatografica Supelcosil LC-8 150x4,6 mm, dimensione particelle 5 µm, flusso 1,2 mL/min. Gradiente (acetonitrile + acido acetico 1%/acqua + acido acetico 1%): da 35:65 (inizio gradiente) a 100:0 in 20 min, volume iniettato 10 µL.

7.2.2 Estrazione SPE con cartuccia di carbone grafitato

Condizionare la cartuccia SPE con 6 mL di diclorometano/metanolo 80:20, 2 mL di metanolo e 14 mL di acqua a pH=2. Portare il pH del campione acquoso a 2 con acido solforico.
Far passare il campione (1 litro o 50 mL, rispettivamente per acque superficiali o di scarico), attraverso la cartuccia SPE ad un flusso di 60-70 mL/min. Successivamente far passare 7 mL di acqua distillata (per eliminare i sali) per gravità, portare a secco il substrato adsorbente sotto vuoto, lavare con 0,5 mL di metanolo (per eliminare l'acqua residua) avendo cura di farlo passare lentamente regolando opportunamente il vuoto e quindi portare a secco sotto vuoto per un minuto. Invertire la cartuccia introducendo in essa un pistone cilindrico di teflon, avente base conica e una punta di tipo Luer, fino a venire a contatto con il setto superiore della cartuccia stessa. Eluire i fenoli con 6 mL di una miscela diclorometano/metanolo 80:20 (v/v) contenente TBAF 10 mM. Portare a secco con un moderato flusso di azoto e riprendere con 0,5 mL della fase mobile di partenza del gradiente cromatografico. Analizzare l'estratto ottenuto mediante HPLC-UV.
La Fig. 2 mostra una tipica separazione di fenoli con questa procedura.

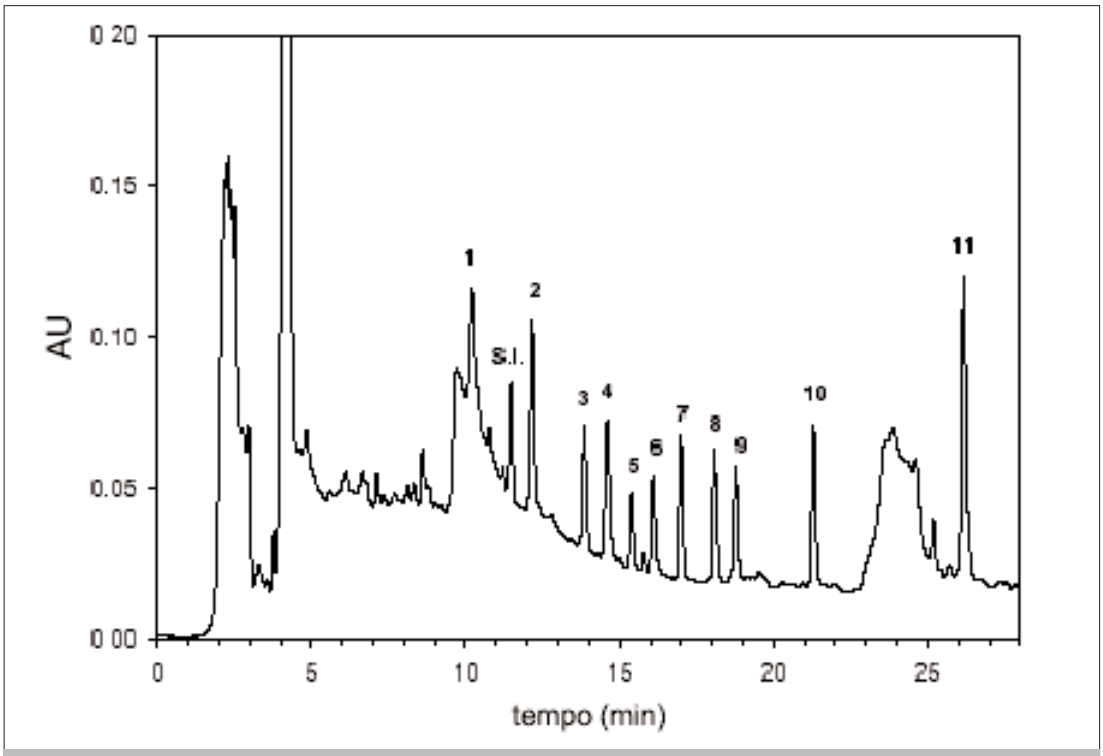


Figura 2: Cromatogramma ottenuto a 220 nm di un campione di acqua di pozzo contaminato con 5 ppb di ciascun composto fenolico di Tab. 1, estratto con cartuccia di carbone grafitato "Carbograph-4" da 500 mg. Condizioni analitiche: colonna cromatografica Alltech Alltima C18 250x3 mm, dimensione particelle 5 µm, flusso 0,6 mL/min. Gradiente (acetonitrile + TFA 0,025%/acqua + TFA 0,025%): da 22/78 (inizio gradiente) a 90/10 in 20 min, volume iniettato 10 µL.

7.2.3 Estrazione SPE con cartuccia di materiale polimerico con fase stazionaria polare o di materiale siliceo con fase stazionaria C_{18} o C_8

Condizionare la cartuccia SPE secondo quanto suggerito dal produttore della cartuccia. Portare il pH del campione acquoso a 2 con acido solforico.
Far passare il campione (1 litro o 50 mL, rispettivamente per acque superficiali o di scarico), attraverso la cartuccia SPE al flusso suggerito dal produttore della cartuccia. Successivamente far passare 5 mL di acqua distillata (per eliminare i sali) e portare a secco il substrato adsorbente con un flusso di azoto o sotto vuoto. Eluire i fenoli con una miscela il cui volume e la cui composizione sono consigliati dal produttore. Portare a secco con un moderato flusso

di azoto e riprendere con 0,5 mL della fase mobile di partenza del gradiente cromatografico. Per evitare la perdita dei fenoli più volatili si possono utilizzare alcuni accorgimenti descritti nel Sottoparagrafo 7.2.4. L'estratto ottenuto viene analizzato mediante HPLC-UV.
La Fig. 3 mostra una tipica separazione di fenoli con questa procedura.

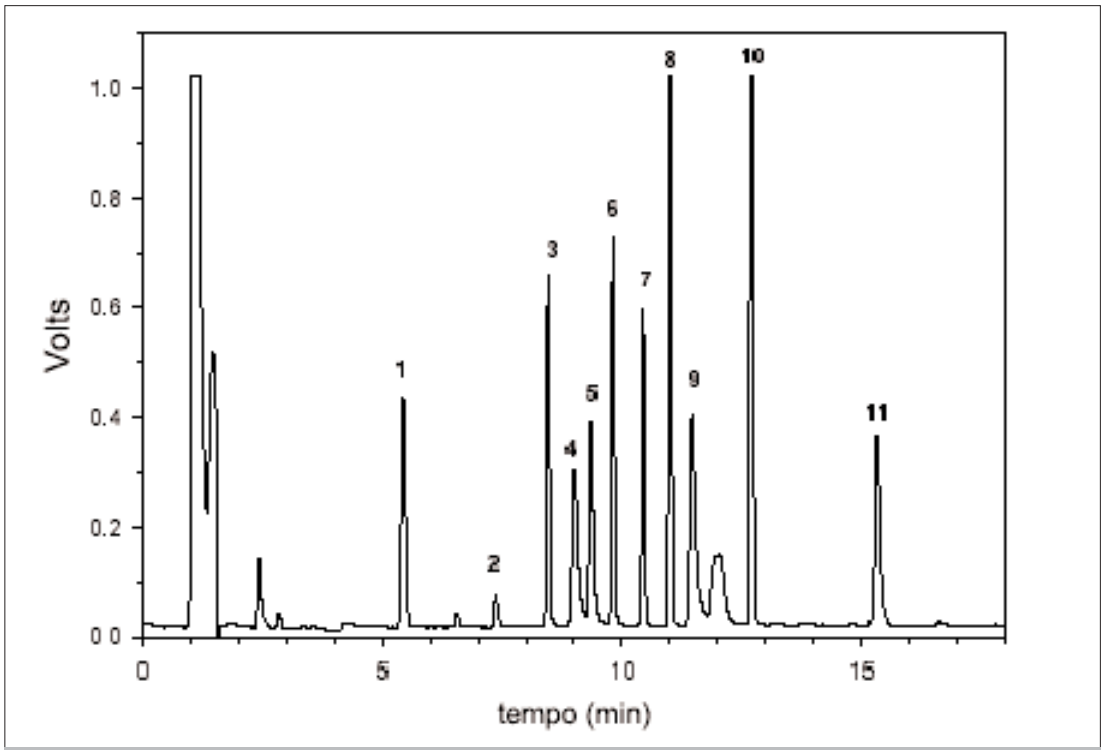


Figura 3: Cromatogramma ottenuto a 220 nm di un campione di acqua superficiale contaminato con 36,5 ppb di ciascun composto fenolico di Tab. 1, estratto con cartuccia ENV+ Isolute da 500 mg. Condizioni analitiche: colonna cromatografica Waters Resolve C_{18} 150x3,9 mm, dimensione particelle 5 µm, flusso 1 mL/min. Gradiente (acetonitrile/acqua + TFA 0,02%): 20/80 (inizio gradiente) per 2 min, 80/20 al tempo 15 min, volume iniettato 50 µL.

7.2.4 Accorgimenti per evitare la perdita dei fenoli più volatili

La concentrazione del volume dell'estratto risulta essere lo stadio più critico dell'intero procedimento a causa della possibile perdita per evaporazione dei fenoli più volatili. Per minimizzare tale inconveniente, prima di portare a secco l'estratto, si può aggiungere un'aliquota di soluzione di TBAF, in modo che la sua concentrazione finale risulti essere di 10 mM. Questo consente la formazione di coppie ioniche fenoli-TBA la cui volatilità è molto bassa.
Alternativamente si può aggiungere una soluzione di carbonato di sodio in modo da trasformare i fenoli in fenati la cui volatilità è molto bassa.

8. Calcoli

Iniettare nel cromatografo volumi uguali di campione e di soluzioni di riferimento diluite (6.6.2). Costruire quindi le rette di taratura per i singoli fenoli, accertandosi di operare nel campo di linearità dello strumento, riportando in grafico l'area del picco del componente (A) in funzione della concentrazione del componente stesso e interpolando i punti sperimentali con il metodo dei minimi quadrati. Ricavare il coefficiente angolare (a) e l'intercetta (b) della retta di taratura. La concentrazione incognita di ogni componente è data dalla relazione:

$$C = \frac{A - b}{a} \cdot \frac{V_f}{V_i}$$

dove:
C = concentrazione (µg/L) di fenolo;
A = area del picco del fenolo nella miscela incognita;
b = valore dell'intercetta della retta di taratura;
a = valore del coefficiente angolare della retta di taratura;
V_f = volume (mL) dell'estratto finale;
V_i = volume (mL) del campione acquoso.

Nel caso in cui si utilizzi il riferimento interno, si riporta in grafico il rapporto area picco componente/area picco riferimento interno (A/A_{si}) in funzione della concentrazione del componente stesso. La concentrazione incognita di ogni componente (C), espressa in µg/L, è data dalla relazione:

$$C = \frac{A/A_{si} - b}{a} \cdot \frac{V_f}{V_i}$$

dove:
C = concentrazione (µg/L) di fenolo;
A = area del picco del fenolo nella miscela incognita;
A_{si} = area del picco del riferimento interno nella miscela incognita;
b = valore dell'intercetta della retta di taratura;
a = valore del coefficiente angolare della retta di taratura;
V_f = volume (mL) dell'estratto finale;
V_i = volume (mL) del campione acquoso.

9. Qualità del dato

Le iniezioni del campione e delle soluzioni di riferimento vanno ripetute almeno due volte al fine di migliorare l'accuratezza delle misure sperimentali. Per verificare la ripetibilità della risposta strumentale si consiglia di effettuare 10 iniezioni di una delle soluzioni di riferimento.
Le procedure sperimentali sopra riportate sono state verificate mediante una sperimentazione interlaboratorio che ha coinvolto 5 laboratori di riferimento nazionali. Detta sperimentazione ha consentito di stabilire che i recuperi dei vari fenoli sono superiori al 75% con un coefficiente di variazione inferiore al 10%.
Pertanto si consiglia di ripetere il procedimento di concentrazione qualora, durante la procedura di concentrazione, venga riscontrato un recupero inferiore al 50%.

Nota: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".*
Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed. (Washington, APHA).

ASTM (1981): "*Annual Book of ASTM Standards*", Part 31, Water, Method D 1783.

BAID R.B., CAEMONA L.G. & JENKINS R.L. (1977): "The direct-injection GLC analysis of Xylenols in industrial wastewaters", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **17**, 764-767.

BALDWIN D.A. & DEBOWSKI J.K. (1988): "Determination of phenols by HPLC down to ppt levels", *Chromatographia*, **26**, 186-190.

BUIKEMA A.L., MCGINNIS M.J. & CAIRNS J.JR. (1979): "Phenolics in aquatic ecosystems: a selected review of recent literature", *Marine Environ. Res.*, **2**, 87-181.

DI CORCIA A., PASSARIELLO G.M., MARCHESE S. & CAPRI S. (1997): "Dosaggio di fenoli nelle acque: estrazione per mezzo di Carbon Black grafitizzato e quantificazione mediante HPLC", *Notiziario dei Metodi Analitici IRSA*, gennaio 1997, 1-10.

EMERSON E., BEACHAM H.H. & BEAGLE L.C. (1943): "The Condensation of Aminoantipyrine. II. A New Color Test for Phenolic Compounds", *J. Org. Chem.* **8**, 417.

KOZAK V.P., SIMSIMAN G.V., CHESTERS G., STENSBY D. & HARKIN J. (1979): "*Reviews of Nat. Lab.*", ORNL/EIS-128, EPA/600/10.

LACORTE S. & BARCELO D. (1994): "Rapid degradation of fenitrothion in estuarine waters", *Environ. Sci. Technol.*, **28**, (6), 1159-1163.

ONG C.P., LEE H.K. & LI S.F.Y. (1989): "Optimization of mobile phase composition for HPLC analysis of eleven priority substituted phenols", *J. Chromatogr.*, **462**, 405-410.

REALINI P.A. (1981): "Determination of priority pollutants phenols in water by HPLC", *J. Chromatogr. Sci.*, **13**, 124.

5080. Idrocarburi policiclici aromatici

Introduzione

Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) rappresentano una delle più significative classi di composti chimici il cui monitoraggio in varie matrici ambientali, quali aria, acqua e sedimenti, è di fondamentale importanza allo scopo di valutare l'impatto che questi inquinanti hanno sull'ambiente e sull'uomo.
L'attenzione allo sviluppo di metodi di identificazione e successiva quantificazione degli idrocarburi policiclici aromatici in varie matrici ambientali è legata alla riconosciuta azione cancerogena che alcuni di questi composti hanno dimostrato.
Questi idrocarburi sono il risultato di diverse attività industriali; possono inoltre essere rilasciati nelle acque potabili dal rivestimento bituminoso delle tubature. In ragione della loro natura idrofobica e della loro bassa solubilità tendono ad accumularsi nel particolato aeriforme organico ed inorganico che sotto l'azione degli agenti atmosferici può essere diffuso in tutto l'ecosistema.
Gli IPA si sviluppano durante i processi di combustione incompleta di combustibili fossili come carboni e petroli, nella combustione della biomassa e dalle emissioni del traffico veicolare. L'origine di tali composti è prevalentemente di tipo antropico, ma esistono anche delle fonti di tipo naturale come l'autocombustione delle foreste o biosintesi ad opera di batteri, funghi ed alghe (questa sintesi avviene in misura maggiore nei sedimenti profondi e anaerobici).
Gli IPA sono inquinanti ubiquitari in quanto possono essere ritrovati in tracce anche in ambienti remoti, quindi lontani dall'attività industriale principale responsabile della loro produzione, per opera del trasporto e delle precipitazioni atmosferiche.
Gli IPA per la loro lipofilicità presentano mediamente una solubilità piuttosto ridotta (<1 mg/L) che tende comunque a diminuire con l'aumento del peso molecolare. Per questo motivo questi composti tendono a lasciare la fase acquosa ed a formare legami con le particelle in sospensione o a depositarsi nei sedimenti dove è presente una grande quantità di carbonio organico. Un altro comparto verso il quale gli IPA presentano particolare affinità è il biota, per la presenza di grassi nei tessuti degli organismi. Questo rappresenta un grave problema ecotossicologico poiché, pur dimostrando bassa tossicità acuta, alcuni IPA si sono rivelati degli agenti cancerogeni e genotossici.
La pericolosità di questi composti dipende anche dalla loro persistenza che diventa molto elevata quando sono presenti più di due o tre anelli o quando le condizioni ambientali sono riducenti. La tossicità può aumentare in seguito all'esposizione alla luce, in particolare ai raggi UV.
La degradazione degli IPA può avvenire con una reazione relativamente rapida sull'interfaccia acqua-sedimento a carico di alcuni batteri aerobi. Questi microrganismi possiedono degli enzimi in grado di incorporare una molecola di ossigeno ad ogni singolo anello aromatico sotto forma di due gruppi ossidrili. Il prodotto della reazione è un intermedio aromatico chiamato catecolo. I gruppi ossidrilici hanno una funzione destabilizzante in quanto l'ulteriore incorporazione di una molecola di ossigeno al catecolo porta all'apertura dell'anello aromatico. Il composto così generato è un acido carbossilico che viene successivamente scisso a formare degli intermedi del ciclo di Krebs. Nei sedimenti più profondi, invece, tale reazione è per lo più inibita in quanto l'ossigeno disciolto nella colonna d'acqua diffonde molto lentamente nei sedimenti e viene rapidamente utilizzato dai microrganismi presenti sull'interfaccia acqua-sedimento. In questo modo nelle zone sottostanti vengono a crearsi delle condizioni di anaerobiosi che rendono impossibile la degradazione precedentemente descritta.

1. Principio del metodo

Il metodo prevede la determinazione quantitativa di alcuni tra i principali idrocarburi policiclici aromatici in campioni di acque potabili, di falda , superficiali e di scarico mediante estrazione liquido-liquido o su fase solida ed analisi in gascromatografia/spettrometria di massa (HRGC/LRMS) con detector a selezione di massa, oppure in cromatografia liquida (HPLC) con rivelatore ultravioletto (UV) e a fluorescenza.
Nel caso di matrici complesse l'analisi in HRGC/LRMS deve essere preceduta da una purificazione dell'estratto organico su gel di silice in modo da isolare la frazione contenente gli idrocarburi policiclici aromatici dagli interferenti idrocarburi alifatici.
Il riconoscimento e la quantificazione dei singoli IPA è basata sul confronto dei tempi di ritenzione dei picchi del cromatogramma ottenuto dall'analisi dell'estratto organico del campione acquoso con quelli ottenuti da idonee soluzioni di riferimento.
La determinazione quantitativa degli IPA viene effettuata con le aree dei rispettivi picchi cromatografici sulla base di opportune rette di taratura di soluzioni di riferimento.

2. Campo di applicazione

Il metodo consente di dosare gli analiti riportati in Tab. 1 ad una concentrazione non inferiore a 0,005 µg/L.

Tabella 1: Idrocarburi policlici aromatici analizzabili con il presente metodo

	Composto
1	naftalene
2	acenaftene
3	acenaftilene
4	fluorene
5	fenantrene
6	antracene
7	fluorantene
8	pirene
9	benzo (a) antracene
10	crisene
11	benzo (k) fluorantene
12	benzo (j) fluorantene
13	benzo (b) fluorantene
14	benzo (a) pirene
15	benzo (e) pirene
16	perilene
17	dibenzo (a,h) antracene
18	indeno (1,2,3-c,d) pirene
19	benzo (g,h,i) perilene

Oltre ai composti riportati in Tab. 1, il metodo consente la determinazione di altri idrocarburi con caratteristiche simili.

3. Interferenze e cause di errore

Tutti quei composti organici con tempi di ritenzione coincidenti a quelli dei composti in esame possono essere considerati interferenti; procedimenti di purificazione utilizzati per isolare gli IPA possono ridurre al minimo queste interferenze.
Solventi, reagenti, vetreria, contaminazione dell'ambiente di lavoro possono essere causa di artefatti ed elevate linee di base che possono determinare errori nell'interpretazione dei dati

cromatografici. Si deve dimostrare che tutti i materiali non diano interferenze nelle condizioni di analisi adottate con l'utilizzo di prove in bianco.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione vengono eseguiti conformemente alle norme generali riportate nella Sezione 1030 "Metodi campionamento". Il campionamento deve essere effettuato in bottiglie di vetro della capacità 1-2 L. Le bottiglie e i tappi (possibilmente con sottotappi in teflon) devono essere risciacquati con acetone e seccati prima dell'uso.
I campioni vanno conservati al buio ed in frigorifero a 4°C (è consigliabile effettuare le operazioni di estrazione il più presto possibile e comunque non oltre 48 ore).

5. Apparecchiature

Normale vetreria di laboratorio che dopo il lavaggio deve essere sciacquata con acqua bidistillata, con acetone e seccata prima dell'uso.

5.1 Bottiglie di vetro da 1 o 2 L

5.2 Imbuti separatori di vetro Pyrex di varie capacità con rubinetto e tappi di teflon.

5.3 Matracci e pipette (classe A) di varie capacità ed accuratamente pulite.

5.4 Flaconi di vetro di varie capacità con tappi in gomma teflonata.

5.5 Microsiringhe per liquidi di varie capacità.

5.6 Palloni da 250 mL in Pyrex con cono normalizzato.

5.7 Bilancia analitica

5.8 Evaporatore rotante

5.9 Colonne per cromatografia in vetro (1 cm d.i., 30 cm lunghezza) dotate di setto poroso G0, rubinetto in teflon e serbatoio da 50 mL.

5.10 Gascromatografo, equipaggiato con colonne capillari e rivelatore a selezione di massa con sistema di integrazione dati (HRGC/LRMS).

In alternativa:

5.11 HPLC

Si consiglia l'uso di uno strumento dotato di rivelatore UV (a lunghezza d'onda variabile) e/o fluorescenza e di colonna a fase inversa. La fase mobile è costituita da una miscela di acetonitrile/acqua o metanolo/acqua. L'analisi viene effettuata in gradiente la cui composizione e durata, così come il flusso di lavoro, dipende dal tipo e dalle dimensioni della colonna utilizzata.

5.12 Colonna capillare per GC e colonna per HPLC

6. Reattivi

6.1 Acqua bidistillata esente da sostanze interferenti.

6.2 Solventi (esano, cicloesano, diclorometano, etilacetato, metanolo, acetonitrile, pentano, acetone) per uso pesticidi.

6.3 Sodio solfato anidro

6.4 Sodio cloruro RPE per analisi

6.5 Gel di silice 70/230 mesh

6.6 Cartucce per estrazione in fase solida (es. Empore disc C_8 47 mm).

6.7 Lana di vetro silanizzata

6.8 Riferimenti interni deuterati: naftalene D8, acenaftene D10, fenentrene D10, crisene D12, perilene D12.

6.9 Soluzioni di riferimento concentrate di IPA (1000 mg/L)

Per la preparazione delle soluzioni di riferimento per la taratura devono essere impiegati composti di purezza superiore al 98%.
I riferimenti primari si preparano pesando esattamente in un matraccio tarato da 25 mL una quantità di 25 mg di ciascun idrocarburo e portando a volume con metanolo.
Queste soluzioni madri possono essere conservate in congelatore e sono stabili per sei mesi se conservate in congelatore, per due mesi se conservate in frigorifero a 4°C. In modo analogo vengono preparate le soluzioni concentrate per i riferimenti interni ad una concentrazione nominale di 500 mg/L.
Possono essere utilizzate soluzioni di riferimento multicomponente ad una concentrazione di 2000 mg/L purchè vendute con certificato di analisi.

6.10 Soluzione di riferimento diluita di IPA (20 mg/L)

In un matraccio tarato da 25 mL introdurre 0,5 mL di ciascuna delle soluzioni da 1000 mg/L ad esclusione dei riferimenti interni e portare a volume con metanolo. Nel caso si utilizzino soluzioni di riferimento multicomponente già preparate queste vengono diluite in modo da ottenere una soluzione a 20 mg/L.
La soluzione dei riferimenti interni (SI metanolo) da utilizzare per le soluzioni di riferimento diluite viene preparata prelevando 1 mL delle soluzioni concentrate di ciascun componente e portando a volume in un matraccio tarato da 50 mL con metanolo.
La soluzione dei riferimenti interni da addizionare al campione (SI acetone) viene preparata prelevando 0,1 mL delle soluzioni concentrate di ciascun componente e portando a volume in un matraccio tarato da 50 mL con acetone. La soluzione conservata in fiale silanizzate e in congelatore è stabile per due mesi.

6.11 Soluzioni diluite per taratura

Le soluzioni diluite utilizzate per la taratura sono ottenute diluendo opportunamente con metanolo la soluzione diluita di IPA (6.10).

6.11.1 Soluzione di riferimento IPA a 2 mg/L (Stdipa2)

In un matraccio tarato da 10 mL introdurre 1,0 mL della soluzione diluita (6.10) e 1,0 mL della soluzione SI metanolo e portare a volume con metanolo.

6.11.2 Soluzione di riferimento IPA a 0,2 mg/L (Stdipa02)

In un matraccio tarato da 10 mL introdurre 0,1 mL della soluzione diluita (6.10) e 1,0 mL della soluzione SI metanolo e portare a volume con metanolo.

7. Procedimento

7.1 Estrazione

7.1.1 Estrazione liquido/liquido

Trasferire quantitativamente il campione di acqua in un imbuto separatore da 2 L. Risciacquare accuratamente la bottiglia con 50 mL di diclorometano.
Aggiungere il riferimento interno 0,1 mL (SI acetone) agitando per una accurata distribuzione.
Aggiungere il solvente di estrazione diclorometano (50 mL), agitare vigorosamente per 2 minuti.
Lasciare decantare e trasferire l'estratto ottenuto in un pallone da 250 mL. Ripetere l'estrazione altre due volte con uguali aliquote di solvente (50÷60 mL). Riunire gli estratti e anidrificarli con solfato di sodio anidro.
Concentrare a piccolo volume (circa 5 mL) l'estratto organico con evaporatore rotante; la temperatura del bagno termostatatico non deve essere superiore a 40°C.
Dopo aver concentrato l'estratto a circa 1 mL sotto flusso di azoto trasferirlo quantitativamente in una fiala da 4 mL con diclorometano.
Fare attenzione durante le fasi di concentrazione a non andare a secco con l'estratto per non perdere gli IPA più volatili.

7.1.2 Estrazione su fase solida

Gli analiti vengono estratti tramite estrazione su fase solida (SPE) utilizzando Empore disk C_{18} (o cartuccia C_{18}). Lavare il disco con 10 mL di diclorometano e condizionarlo aggiungendo metanolo (10 mL) sotto vuoto. Rimuovere l'eccesso di solvente con acqua esente da contaminanti organici (10 mL). Far passare 2 litri di campione contenente 10 mL di metanolo attraverso il disco sotto un vuoto di 10 cm di Hg.
Durante questa operazione è necessario prevenire che il disco vada a secco controllando il vuoto e chiudendolo al momento opportuno.
Alla fine della filtrazione, far passare aria attraverso la membrana per alcuni minuti per rimuovere l'eccesso di acqua.
Eluire gli analiti facendo passare diclorometano (10 mL) con un vuoto moderato (circa 0,5 cm di Hg). Raccogliere l'eluato in provetta graduata e concentrare sotto flusso di azoto a temperatura ambiente a piccolo volume (esattamente misurato).

7.2 Purificazione dell'estratto su colonna di gel di silice

7.2.1 Preparazione della fase stazionaria

Purificare il gel di silice con diclorometano in Soxhlet per 12 ore. Evaporare il solvente residuo con evaporatore rotante e successivamente in stufa a 35°C. Attivare il gel di silice in stufa a 250°C per 16 ore e raffreddarlo in essiccatore sotto vuoto.
Attivare il sodio solfato a 400°C per 8 ore e raffreddarlo in essiccatore sotto vuoto. Le fasi stazionarie, conservate in essiccatore sotto vuoto, sono attive per 5 giorni.

7.2.2 Preparazione della colonna cromatografica

Pesare in una beuta da 50 mL, munita di tappo smeriglio, 6,0 g di gel di silice, aggiungere 5 mL di una miscela esano/acetone 8:2 (v:v) e chiudere la beuta. Agitare e lasciare la beuta immersa in un bagno ad ultrasuoni per 5 minuti.

Introdurre nella colonna cromatografica pochi millilitri di esano. Trasferire nella colonna parzialmente riempita con esano, il gel di silice avendo cura che non si formino bolle d'aria. Aggiungere 2,0 g di solfato di sodio mantenendo la colonna sempre bagnata da esano. Condizionare la colonna con 10 mL di esano degasato mediante ultrasuoni.

7.2.3 Eluizione cromatografica

Portare l'estratto del campione proveniente dal trattamento 7.1.1 ad un volume di 0,5 mL in esano mediante leggero flusso di azoto (prepurificato per passaggio su setacci molecolari) e caricare quantitativamente il campione aiutandosi se necessario con una piccola quantità di esano. Eluire per gravità in successione con:

- 30 mL di esano (prima frazione di scarto contenente gli alifatici);
- 20 mL acetone/esano 1:1 (v/v) (seconda frazione contenente gli IPA).

Concentrare lentamente la seconda frazione in evaporatore rotante fino a 0,5 mL (evitando di andare a secco), quindi trasferirla in una fiala da 1,8 mL aiutandosi con esano. Aggiustare il volume fino ad una quantità nota compresa tra 0,5-1 mL (con esano o mediante leggero flusso di azoto, prepurificato per passaggio su setacci molecolari) a seconda delle concentrazioni attese. Fino al momento dell'analisi conservare l'estratto a 4°C al buio.

7.3 Analisi dell'estratto

7.3.1 Analisi in HRGC/LRMS

L'estratto organico proveniente dalla procedura di estrazione 7.1.1 o 7.1.2 può essere analizzato direttamente in HRGC/LRMS oppure, nel caso di matrici complesse, sottoposto a purificazione su colonna di gel di silice come descritto in (7.2) e poi analizzato.
È opportuno prima di iniziare l'analisi porre il forno alla massima temperatura raggiunta dall'analisi e monitorare la linea di base fino a che questa resti costante.
L'acquisizione di dati viene eseguita sui soli ioni caratteristici dei composti da analizzare. Qui di seguito viene riportata a titolo di esempio la tabella con gli ioni di quantificazione e conferma di una serie di IPA. È compito dell'operatore valutare la necessità di inserire altri ioni a seconda delle richieste.

Analita	Massa M1 quantificazione	Massa M2 Conferma	% M2/M1	Calcoli con riferimento interno
Naftalene	128	64	6	Naftalene D8
Acenatilene	152	76	13	Naftalene D8
Acenaftene	154	152	51	Acenaftene D10
Fluorene	166	164	12	Acenaftene D10
Fenantrene	178	89	8	Fenantrene D10
Antracene	178	89	9	Fenantrene D10
2-fenilnaftalene	204	101	11	Fenantrene D10
Fluorantene	202	101	9	Fenantrene D10
Pirene	216	101	12	Fenantrene D10
Benzo(a)fluorene	216	215	74	Fenantrene D10
Benzo(b)fluorene	228	215	74	Fenantrene D10
Benzo(a)antracene	228	114	7	Fenantrene D10
Crisene	252	114	7	Crisene D12
Benzofluoranteni (b+k+j)	252	126	8	Crisene D12
benzo(e)pirene	252	126	6	Crisene D12
benzo(a)pirene	252	126	6	Crisene D12
Perilene	276	126	8	Perilene D12

segue

segue

Analita	Massa M1 quantificazione	Massa M2 Conferma	% M2/M1	Calcoli con riferimento interno
indeno(1, 2, 3-cd) pirene	278	138	3	Perilene D12
Dibenzo(a,h) antracene	276	139	3	Perilene D12
Coronene	300	138	6	Perilene D12
		150	6	Perilene D12
Riferimento interno	**Massa M1 quantificazione**			**Recupero medio % ± scarto tipo**
Naftalene D8	136			85,2 ± 3,1
Acenaftene D10	164			91,4 ± 2,1
Fenantrene D10	188			93,1 ± 2,2
Crisene D12	240			89,8 ± 2,9
Perilene D12	364			88,4 ± 3,3

In Fig. 1 è riportato un tipico cromatogramma ottenuto analizzando l'estratto in HRGC/LRMS.

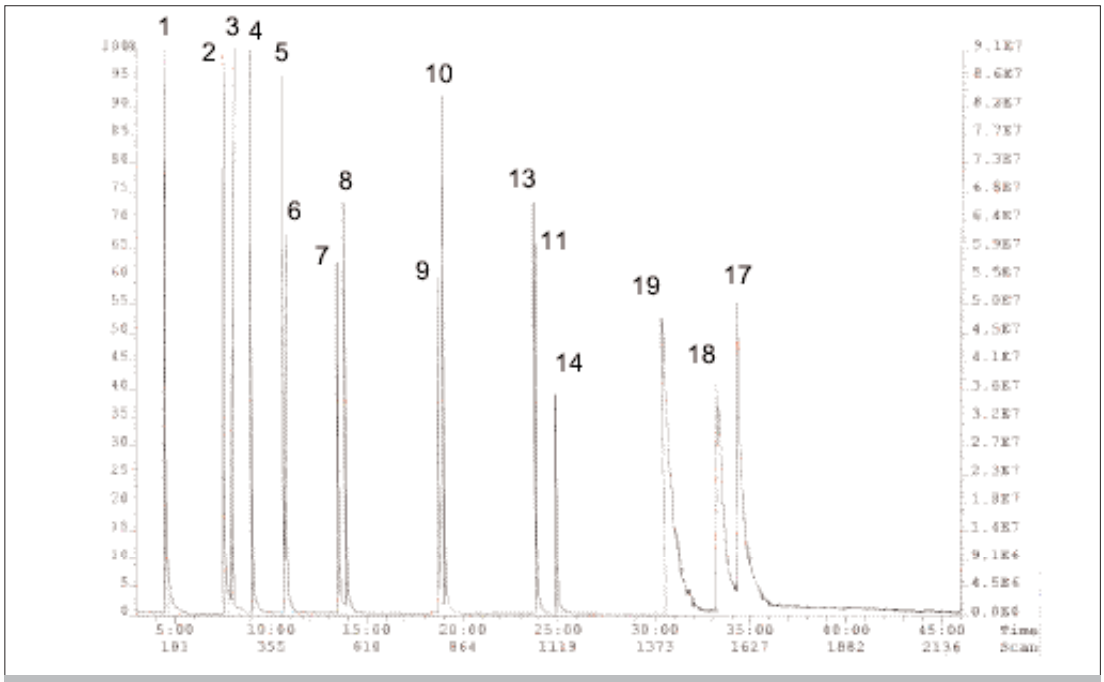


Figura 1: Cromatogramma di un campione di acqua di falda contaminato con 20 ppb di alcuni IPA ottenuto analizzando l'estratto in HRGC/LRMS. Condizioni gas-cromatografiche: iniettore "splitless" ("liner" silanizzato da 800 µL); T = 295°C, "purge" time = 45 sec; linea di trasferimento MS a 300°C; temperatura forno 60°C per 1 minuto, rampa a 25°C/min fino a 200°C, rampa a 10°C/min fino a 270°C, isoterma per 6 minuti, rampa a 25°C/min fino a 295°C, isoterma per 12 minuti; gas di trasporto elio a 10 psi, flusso di "split" 60 mL/min. Condizioni operative dello spettrometro di massa: temperatura sorgente = 260°C, sorgente ad impatto elettronico (EI), potenziale di ionizzazione 70 eV.

7.4 Analisi in HPLC/fluorescenza

Per effettuare l'analisi in HPLC/fluorescenza l'estratto organico proveniente dalla procedura di estrazione (7.1.1 o 7.1.2) deve essere reso compatibile con la fase mobile impiegata. Ciò viene realizzato concentrando a 100 µL l'estratto in diclorometano e aggiungendo acetonitrile fino ad un volume finale di 1 mL.
Il rivelatore a fluorescenza viene usato per la determinazione simultanea dei differenti com-

posti. Le lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione vengono variate in dipendenza del tipo di colonna e delle condizioni cromatografiche utilizzate. A titolo di esempio, nella seguente Tab. 2 sono riportate le lunghezze d'onda di eccitazione e di emissione utilizzate nel cromatogramma di Fig. 2.

Tabella 2: Tempi di ritenzione e lunghezza d'onda

Tempo di ritenzione (min)	eccitazione (nm)	emissione (nm)
< 0	250	360
17,9	375	425
20,5	335	440
24,8	350	430
33,5	305	500

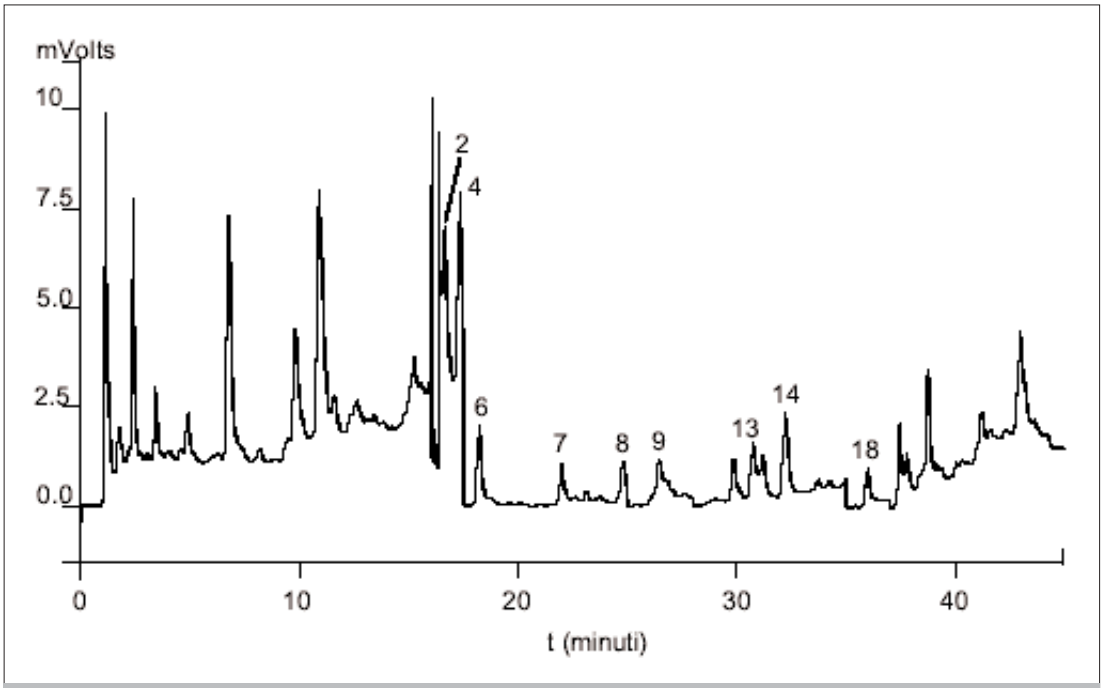


Figura 2: Cromatogramma di un campione di acqua superficiale contaminato con 0,1 ppb di alcuni IPA ottenuto analizzando l'estratto in HPLC/fluorescenza. Condizioni operative: colonna C_{18} (Analytical Technology) (250 x 4 mm, 5 µm), flusso = 1 mL/min, 50/50 acqua/acetonitrile (isocratica per 6 min), gradiente a 30/70 in 24 min, gradiente a 20/80 in 10 min, gradiente a 0/100 in 10 min; volume iniettato = 10 µL.

8. Calcoli

Iniettare nel cromatografo volumi uguali di estratto e di soluzioni di riferimento diluite (6.11). Costruire quindi le rette di taratura per i singoli IPA, accertandosi di operare nel campo di linearità dello strumento. La quantificazione viene effettuata mediante la tecnica del riferimento interno.
Riportare in grafico il rapporto area picco componente/area picco riferimento interno (A/A_{si}) in funzione della concentrazione del componente stesso.
La concentrazione incognita di ogni componente è data dalla relazione:

$$C = \frac{A/A_{si} - b}{a} \cdot \frac{V_f}{V_i}$$

dove:

C = concentrazione (μg/L) di analita;
A = area del picco dell'analita nella miscela incognita;
A_{si} = area del picco del riferimento interno nella miscela incognita;
b = valore dell'intercetta della retta di taratura;
a = valore del coefficiente angolare della retta di taratura;
V_f = volume (mL) dell'estratto finale;
V_i = volume (mL) del campione acquoso.

9. Qualità del dato

Le iniezioni del campione e dei riferimenti interni vanno ripetute almeno due volte al fine di migliorare l'accuratezza delle misure sperimentali. Per verificare la ripetibilità della risposta strumentale si consiglia di effettuare 10 iniezioni di una delle soluzioni di riferimento.
Valutare il recupero dei riferimenti interni effettuando cinque determinazioni su una matrice reale.
Il recupero di ogni riferimento interno calcolato rispetto alla soluzione di lavoro deve essere maggiore del 50%. Si raccomanda di riestrarre e rianalizzare i campioni, i cui recuperi sono inferiori al 40% o maggiori del 120%.

Nota: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".*
Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Edition, (Washington, APHA).

GUIDOTTI M. (1996): "Presenza di idrocarburi policiclici aromatici e composti organoclorurati persistenti in sedimenti di acque superficiali", *Acqua e aria*, **9**, 783-785.

IRSA (1999): "Metodi analitici per i fanghi - Idrocarburi policiclici aromatici", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **64**, Roma.

MC CONKEY B.J., DUXBURY C.L., DIXON D.G. & GREENBERG B.M. (1997): "Toxicity of PAH photoxidation product to the bacteria *Photobacterium Phosphoreum* and the duckweed *Lemna Gibba*: effects of phenanthrene and its primary product phenanthroquinone", *Environ. Toxicol. and Chemistry*, **16**, 892-899.

WILCOCK R.J., CORBAN G.A., NORTHCOTT C.L. & LANGDON A.G. (1995): "Persistence of polycyclic aromatic compounds of different molecular size and water solubility in surfacial sediment of interstitial sandflat", *Environ. Toxicol. and Chemistry*, **15**, 670-676.

5090. Pesticidi clorurati

I pesticidi clorurati sono composti organici clorurati ad attività insetticida con meccanismo di azione prevalentemente a danno del sistema nervoso. Questi prodotti, unitamente all'esaclorobenzene ed al captano aventi proprietà spiccatamente fungicide, costituiscono una classe di pesticidi di grande rilevanza dal punto di vista della contaminazione ambientale per le caratteristiche di persistenza e tossicità.
Il metodo descritto permette la determinazione dei pesticidi clorurati nelle acque di scarico.
Alcune considerazioni possono essere fatte sulla procedura analitica. Qualsiasi metodo di estrazione capace di rimuovere efficacemente dal campione queste sostanze clorurate per la successiva analisi, può estrarre contemporaneamente anche elevate quantità di sostanze potenzialmente interferenti che in un'acqua di scarico sono generalmente molto abbondanti e di varia natura e possono ostacolare una accurata determinazione analitica. Varie fasi di purificazione dell'estratto possono quindi essere indispensabili e nel metodo ne vengono suggerite alcune, selezionate sulla base della loro efficacia.
In ogni caso, per ridurre la possibilità di errore, l'applicazione della procedura descritta più avanti richiede personale addestrato a questo tipo di determinazioni e l'effettuazione di periodici controlli di qualità. Inoltre, nel caso di risposte positive è ovvio che il chimico responsabile dell'analisi curerà la conferma del risultato con adeguate procedure.
Una importante osservazione deve essere fatta riguardo ai policlorobifenili (PCB). Questi sono composti che presentano un comportamento analogo, nelle diverse fasi della procedura analitica, ai pesticidi clorurati. Anche nella attuale normativa essi sono in genere assimilati ai pesticidi organoclorurati (così come nei metodi EPA per il controllo delle acque di scarico sia civili che industriali), nonostante la diversa utilizzazione e la diversa tossicità. Nonostante ciò, per esigenze schematiche, le procedure di analisi sono descritte in due metodi separati. In questo metodo i PCB sono inclusi nelle interferenze. Per la loro analisi si rimanda al metodo specifico 5110 basato su numerosi riferimenti al presente metodo. Si ricorda infine che la maggior parte dei pesticidi clorurati presi in esame è attualmente soggetta a divieti d'uso come fitofarmaci e quindi è anche limitatissima la produzione, indirizzata quasi esclusivamente alla esportazione. Per quanto riguarda i PCB, dei quali è vietata la produzione e l'uso, la loro eventuale presenza nelle acque di scarico può in generale derivare da operazioni di manutenzione o smantellamento di trasformatori contenenti miscele commerciali di questi composti utilizzati come additivi per gli oli.

1. Principio del metodo

Il metodo consiste in una estrazione liquido-liquido con miscela n-esano/diclorometano, una purificazione preliminare per ripartizione con acetonitrile, una fase di desolforazione seguita da una purificazione/frazionamento per cromatografia su gel di silice ed infine un'analisi gascromatografica con rivelatore a cattura di elettroni. L'operatore, in base alla sua esperienza e in base ad eventuali notizie sul campione (provenienza, possibile presenza di sostanze interferenti, ecc.) potrà, nell'ambito della procedura successivamente descritta, operare delle scelte; potrà scegliere il volume di campione da sottoporre all'analisi e il volume finale al quale concentrare l'estratto, ma soprattutto potrà decidere riguardo all'opportunità o meno di procedere ad una o più fasi di purificazione. Iniezioni dell'estratto concentrato prima delle operazioni di purificazione, anche se possono dare all'operatore informazioni molto utili sull'opportunità delle successive fasi di purificazione, sono in genere sconsigliate perché possono determinare la necessità di intervenire sul rivelatore o sulla colonna per ripristinarne l'efficienza analitica.

L'eliminazione di oli e grassi, spesso presenti nell'estratto di un'acqua di scarico, per ripartizione con acetonitrile, è preferibile al trattamento acido o alcalino che, anche se economico, veloce ed efficiente, distrugge parzialmente o totalmente alcuni pesticidi organoclorurati. La successiva cromatografia con silice disattivata, ampiamente sperimentata e utilizzata permette un'ulteriore purificazione ed un frazionamento dei composti organoclorurati utile per la loro identificazione.
Per quanto riguarda la determinazione finale, alcune delle colonne gascromatografiche con le più idonee fasi stazionarie attualmente reperibili in commercio sono riportate nella sezione relativa alla determinazione gascromatografica. Nel metodo sono indicate altresì le più probabili interferenze, che si possono incontrare nella determinazione di composti organoclorurati in un'acqua di scarico, e alcune tra le migliori tecniche per la loro minimizzazione o eliminazione.
L'analisi qualitativa si basa sul confronto dei tempi di ritenzione dei picchi osservati nel campione con quelli di idonee soluzioni di riferimento. Per la conferma dell'identità delle sostanze individuate è consigliato l'uso di colonne a differente polarità o, nel caso in cui il laboratorio ne sia provvisto, di un rivelatore di massa operante in SIM (Selected Ion Monitoring).
La determinazione quantitativa dei pesticidi organoclorurati è basata sul confronto delle aree dei picchi nel campione e nella soluzione di riferimento. I risultati sono di norma espressi in µg/L.

2. Campo di applicazione

Il metodo permette la determinazione di pesticidi clorurati nelle acque di scarico. In Tab. 1 è riportato l'elenco delle sostanze che possono essere determinate con il presente metodo.
La normativa vigente stabilisce un limite di 0,05 mg/L di pesticidi totali, esclusi i fosforati ma inclusi i PCB e i PCT, nelle acque di scarico (Tab. 3, All. 5 del D.Lgs. 152/99).

Tabella 1: Elenco dei pesticidi clorurati analizzabili con il presente metodo

Esaclorobenzene (HCB)*	p,p'~DDT*
(pentaclorobenzene)	(o,p'-DDT)
Aldrina*	(p,p'-DDE)
Endrina*	(o,p'-DDE)
(endrina aldeide)	(p,p'-DDD)
Dieldrina*	(o,p'-DDD)
HCH esaclorocicloesano: isomeri α, β, δ*	α~clordano*
γ-HCH [lindano]	γ-clordano*
Dicofol [Keltane]	endosulfan α
Pertane	endosulfan β
Eptacloro*	metossicloro
(eptacloro epossido)	captano

** Sostanza il cui impiego in agricoltura o nell'igiene pubblica è vietato o sottoposto a restrizioni di impiego.*
() Prodotti di degradazione o principali impurezze di produzione.
Nota: nell'elenco sono compresi solo composti normalmente classificati come pesticidi clorurati. Non sono stati considerati altri pesticidi che, pur contenendo atomi di cloro o di altri alogeni, sono classificati in base ad altri gruppi funzionali presenti nella molecola (ad esempio erbicidi quali atrazina; 2,4-D).

Il controllo dei limiti di accettabilità imposti dalla attuale normativa per le acque di scarico non pone problemi; infatti il presente metodo di analisi ha un limite di quantificazione per singolo composto in esame inferiore a 0,1 µg/L, ampiamente adeguato ai suddetti limiti normativi (e comunque può essere, senza problemi, ulteriormente abbassato, fino a 1 ng/L, concentrando l'estratto da iniettare per l'analisi gascromatografica a volumi più piccoli di quelli previsti dal metodo).
Per quanto riguarda i volumi di campione da sottoporre all'analisi, in considerazione dei limiti di rivelabilità del metodo e dei limiti di legge, un volume di acqua di 100-500 mL è generalmente sufficiente per le acque di scarico.

3. Interferenze e cause di errore

Solventi, reagenti, vetreria, contaminazione dell'ambiente di lavoro ed ogni trattamento del campione possono causare problemi e portare alla presenza di picchi interferenti nei cromatogrammi e/o alterazioni della corrente di fondo del rivelatore con conseguenti difficoltà di interpretazione e/o interpretazioni errate del tracciato gascromatografico. Tutti i materiali utilizzati pertanto devono essere esenti da interferenze nelle condizioni operative adottate. È quindi buona norma di laboratorio, all'inizio dell'indagine e periodicamente, sottoporre all'intera procedura uno o più "bianchi" sostituendo al campione acqua distillata, per la verifica di eventuali interferenze provenienti da materiali e reagenti. Nel caso di presenza di interferenze, individuarne la provenienza, analizzando ogni singolo passaggio della procedura e procedere alla loro eliminazione. Può essere richiesta una specifica selezione dei reattivi ed una purificazione dei solventi per mezzo di distillazione.
Le sostanze di varia natura coestratte insieme ai pesticidi organoclorurati dagli effluenti industriali sono spesso in quantità non trascurabile e possono causare difficoltà nell'ottenere misure precise ed accurate, soprattutto quando si usa un rivelatore a cattura di elettroni.
Uno dei maggiori problemi nelle determinazioni gascromatografiche di inquinanti organici con rivelatore a cattura di elettroni è rappresentato dagli esteri ftalici, una classe di plastificanti contenuti in varie percentuali nei comuni materiali plastici flessibili dai quali sono facilmente estratti producendo picchi interferenti nel gascromatogramma. Essendo di vastissima diffusione ambientale possono anche provenire dallo stesso laboratorio che effettua le analisi. La loro interferenza può essere mitigata evitando l'uso di questi materiali in laboratorio.
Può essere inoltre necessaria una purificazione dei reagenti (distillazione dei solventi e trattamento in muffola degli altri materiali) e della vetreria (lavaggio con solventi) per eliminare una contaminazione di fondo. Con la purificazione dell'estratto su gel di silice disattivato descritta nel metodo, gli ftalati non vengono eluiti e la loro interferenza viene eliminata.
Altra sostanza che può causare seria interferenza è lo zolfo; la sua interferenza si può manifestare con la saturazione del rivelatore a cattura di elettroni, o, se il livello è più basso, con la presenza di tre o più picchi che possono interferire nella determinazione degli HCH e dell'aldrina. Numerosi sono i metodi descritti in letteratura per rimuovere lo zolfo.
Per la rimozione di composti dello zolfo dall'estratto si possono usare i seguenti metodi: trattamento con solfito di tetrabutilammonio, che converte lo zolfo a tiosolfato; trattamento con una lega rame-alluminio, trattamento con nickel Raney o potassio idrossido; cromatografia con un adsorbente desolforante costituito da allumina (disattivata all'11%), solfito di sodio e idrossido di sodio; infine agitazione dell'estratto con una piccola quantità (0,1 g) di polvere di rame attivato che fa precipitare lo zolfo come solfuro di rame. Considerando l'efficacia di rimozione dello zolfo, i recuperi dei composti organoclorurati, la facilità di esecuzione e la tossicità di alcuni reagenti si raccomanda l'uso della cromatografia con l'agente desolforante; quest'ultima procedura è descritta dettagliatamente nel metodo.
Come prima accennato i policlorobifenili (PCB), classe di composti comprendente 209 congeneri, possono essere considerati una delle interferenze più probabili e meno facilmente eliminabili. Per quanto riguarda le tecniche di separazione per cromatografia su colonna, dalla letteratura risulta che la separazione dei PCB dai pesticidi organoclorurati può essere ottenuta solo parzialmente su Florisil, su allumina o su silice. Con la purificazione su gel di silice disattivato, adottata nel presente metodo, i PCB vengono eluiti nella prima frazione con alcuni pesticidi clorurati. L'uso di colonne capillari e di adeguati programmi di temperatura (con tempi di analisi molto lunghi) può permettere una sufficiente anche se non completa risoluzione dei picchi mentre, se disponibile, l'uso di un rivelatore di massa (GC/MS) permette in genere di quantificare anche picchi eventualmente sovrapposti. Si può inoltre adottare la tecnica di Snyder e Reinert lievemente modificata, per il frazionamento del primo eluato proveniente dalla cromatografia su gel di silice disattivato. La separazione dei PCB dal DDT e DDE che ne risulta può essere utile per una identificazione più sicura dei pesticidi organoclorurati. Tale procedura è descritta in dettaglio al Sottoparagrafo (7.3.4).
Anche i polibromobifenili (PBB), che possono essere utilizzati come ritardanti di fiamma, potrebbero causare interferenza. Il PBB più usato ha la sigla PB-6b (Michigan Chem. Co., St. Louis, U.S.A.) ed è costituito prevalentemente da 2,4,5,2',4',5'esabromobifenile; sono tutta-

via presenti altri 8 composti e isomeri (dal pentabromo all'eptabromobifenile) che contribuiscono a dare un gascromatogramma complesso e simile a quello dei PCB. Se nei campioni da analizzare si sospetta, in base al ciclo produttivo dell'azienda, la presenza di PBB è necessario porre attenzione nell'attribuzione degli eventuali picchi nel cromatogramma del campione e, se disponibile, utilizzare un rivelatore di massa (GC/MS).
Un'altra interferenza può essere rappresentata infine da alcuni esteri fosforici che, quando presenti negli effluenti analizzati, possono essere rivelati con il procedimento indicato per i pesticidi organoclorurati. In particolare con la tecnica di purificazione su gel di silice disattivato, essi possono essere presenti nella seconda frazione. Per gli esteri fosforici che presentano sulle più comuni colonne gascromatografiche tempi di ritenzione vicini a quelli dei composti organoclorurati si possono effettuare controlli analitici sia mediante gascromatografia con rivelatore fotometrico per il fosforo o a ionizzazione di metalli alcalini (NPD), sia mediante l'impiego di tecniche ausiliarie di conferma.

4. Campionamento e conservazione del campione

I campioni vanno prelevati in bottiglie di vetro neutro, possibilmente scuro, della capacità di 1 L con chiusura a smeriglio oppure a vite. Prima del riempimento le bottiglie devono essere risciacquate con la stessa acqua che si desidera campionare. Evitare l'uso di qualsiasi dispositivo in plastica. È buona norma prelevare due aliquote per ciascun campione. Se si sospetta che i campioni così prelevati non siano abbastanza rappresentativi della composizione dell'effluente, allora il campionamento andrà effettuato secondo i criteri e le modalità descritte nella Sezione 1030 "Metodi di campionamento", salvo diverse disposizioni di legge.
I campioni possono essere conservati in frigorifero per una settimana. Eventuali degradazioni microbiche possono essere bloccate dall'aggiunta di HCl concentrato (1 mL/L di campione); è comunque necessario accertare in via preliminare che l'aggiunta di HCl non causi alterazioni quali-quantitative di altri composti eventualmente contenuti nel campione da analizzare.

5. Apparecchiature

5.1 *Gascromatografo* che consenta l'impiego di colonne capillari.

5.2 *Rivelatori*

Rivelatore a cattura di elettroni (ECD). Se disponibile, può essere vantaggiosamente adottato il rivelatore di massa (MS) operante in SIM, soprattutto per l'analisi quantitativa di composti non separabili cromatograficamente.

5.3 *Sistema di acquisizione ed elaborazione dei dati cromatografici*

5.4 *Colonne gascromatografiche*

Le colonne e le fasi stazionarie consigliate per l'analisi dei pesticidi organoclorurati sono descritte nello schema seguente. Si consiglia di utilizzare colonne con rapporto di fase (raggio/2 x spessore di fase) pari a circa 250 e lunghezza non inferiore a 30 m.

Fase stazionaria	Nomi commerciali fase/colonna
Non polare	
metil silicone	SE-30, DB-1, SPB-1*o equivalenti*
5% fenile + 95% metilsilicone	SPB-5, PTE-5, SE-54, ULTRA-2 *o equivalenti*
Polare	
(non dichiarata)	SPB-608
cianopropilsilicone stabilizzato	SP-2331 *o equivalenti*

5.5 Evaporatore rotante, con possibilità di operare con il vuoto, bagno termostatico e adatto sistema per il recupero dei solventi.

5.6 Vetreria

5.6.1 Colonna in vetro per disidratazione su solfato di sodio anidro (lunghezza 10 cm; 3,5 cm d.i.) senza setto poroso, con gambo sfinato (10 mm d.i.). Il setto poroso è sostituito da un piccolo batuffolo di cotone sgrassato, opportunamente inserito nel punto di restringimento in fondo alla colonna. In alternativa si possono utilizzare le colonne per la disidratazione in accordo con le specifiche EPA (serbatoio per 60 mL di estratto, colonna di lunghezza 10 cm e 2 cm d.i., gambo sfinato 8 mm d.i., vedi Fig. 1).

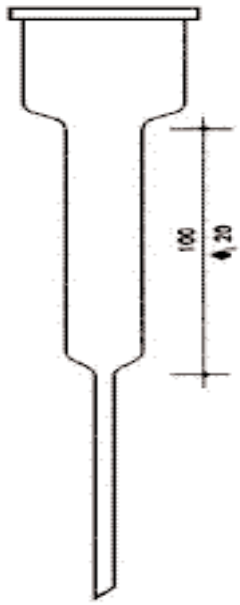


Figura 1: Colonna per disidratazione secondo le specifiche EPA (le misure sono espresse in mm).

5.6.2 Microcolonna in vetro (lunghezza 30 cm; 4,2 mm d.i.), con estremità superiore munita di smeriglio per il collegamento con un serbatoio per l'eluente, per la cromatografia su gel di silice disattivato (Fig. 2).

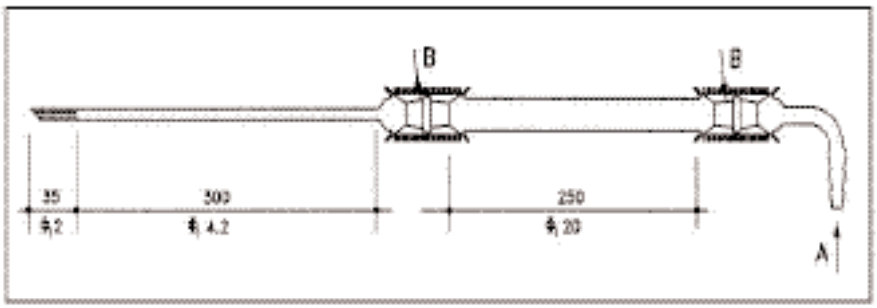


Figura 2: Microcolonna per la separazione di pesticidi ed altri composti in quattro gruppi. A, ingresso aria per ottenere una leggera pressione; B, giunto 10/19 (le misure sono espresse in mm).

5.6.3 Fiale o provette da concentrazione in vetro da 2 mL, 5 mL, 10 mL, 15 mL e 25 mL preferibilmente con gambo sfinato.

5.6.4 Imbuti separatori da 125 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL, muniti di tappo a smeriglio e rubinetto in teflon.

5.6.5 Palloni (preferibilmente a cuore) con cono smeriglio adatto per l'evaporatore rotante, di cui al punto 5.5, aventi capacità 50 mL, 100 mL e 250 mL.

5.6.6 Matracci tarati con tappo smeriglio da 10 mL, 50 mL, 100 mL e 1000 mL.

5.6.7 Pipette tarate (volumi da 0,5 mL a 10 mL).

5.6.8 Altra vetreria normalmente in dotazione in qualsiasi laboratorio chimico (beute con tappo smeriglio, cilindri graduati, imbuti, pipette Pasteur).

5.7 Microsiringhe per gascromatografia (tipo Hamilton o equivalenti) aventi capacità di 5 µL e 10 µL.

5.8 Microsiringhe per dosaggio di liquidi (tipo Hamilton o equivalenti per HPLC) da 25 µL, 50 µL, 100 µL, 250 µL e 500 µL.

5.9 Bilancia analitica, risoluzione 0,1 mg.

6. Reattivi

Tutti i solventi, a meno che non siano specificatamente dichiarati "per analisi di pesticidi" vanno sottoposti a purificazione mediante distillazione con apparecchiature "tutto vetro". È consigliabile che per ogni solvente si disponga di una apposita apparecchiatura di distillazione. Tutti i solventi vanno comunque controllati prima di essere utilizzati, usando le quantità impiegate nella procedura, concentrando al volume finale indicato e controllando mediante analisi gas cromatografica. Analogamente, è sempre consigliato l'uso di reattivi specificatamente dichiarati per "analisi di pesticidi".

6.1 n-Pentano "per analisi pesticidi"

6.2 n-Esano "per analisi pesticidi"

6.3 Diclorometano "per analisi pesticidi"

6.4 Acetonitrile "per analisi pesticidi"

6.5 Benzene "per analisi pesticidi"

6.6 Acqua distillata, esente da sostanze organiche che possano interferire nelle analisi (esempio: ottenuta da acqua distillata trattata su sistemi dotati di apposita cartuccia in carbone attivo). L'acqua deve essere controllata con una prova di "bianco".

6.7 Acido cloridrico concentrato

6.8 Solfato di sodio granulare anidro trattato in muffola a 450°C per almeno 4 ore; conservare in recipiente di vetro ermeticamente chiuso.

6.9 Soluzione satura di cloruro di sodio in acqua distillata (trattato preventivamente in muffola a 450°C per almeno 4 ore e lasciato raffreddare) (6.6). È consigliabile eseguire un'e-

strazione con n-esano (50 mL per 500 mL di soluzione satura) per rimuovere eventuali impurezze residue.

6.9.1 Soluzione al 2% p/p di cloruro di sodio in acqua distillata (trattato preventivamente in muffola a 450°C per almeno 4 ore e lasciato raffreddare) (6.6). È consigliabile eseguire un'estrazione con n-esano (50 mL per 500 mL di soluzione) per rimuovere eventuali impurezze residue.

6.10 Cotone sgrassato in Soxhlet con n-esano/acetone 1:1 (v/v) per 6 ore e lasciato asciugare. Conservare in recipiente di vetro chiuso.

6.11 Gel di silice, tipo 950, 60-200 mesh, attivato in stufa ad aria a 200°C per 8 ore e conservato in beuta con tappo a smeriglio, posta in essiccatore in presenza di agenti essiccanti.

6.12 Gel di silice

Gel di silice (100-200 mesh) disattivato mediante aggiunta di acqua distillata (6.6) al 6,5% (p/p). La disattivazione è effettuata nel seguente modo: a 25 g di gel di silice (trattato a 200°C per 8 ore e conservato in beuta con tappo a smeriglio posta in essiccatore in presenza di agenti essiccanti) viene addizionata la giusta quantità di acqua distillata determinata in base a risultati di prove di taratura dell'adsorbente condotte come descritto al Sottoparagrafo (7.3.3 B). L'aggiunta viene effettuata goccia a goccia in una beuta sotto costante agitazione. Agitare per 20 minuti e lasciare riposare una notte prima dell'uso. Conservare in recipiente ermeticamente chiuso, ma non in presenza di agenti essiccanti. Il gel così preparato conserva le sue caratteristiche per circa una settimana.

6.13 Allumina basica tipo 90 (attività II-III, 70-230 mesh) trattata a 250°C per 6 ore e conservata in beuta con tappo a smeriglio, posta in essiccatore in presenza di agenti essiccanti.

6.14 Sodio solfito, anidro, grado analitico.

6.15 Sodio idrossido, grado analitico.

6.16 Lana di vetro silanizzata

6.17 Agente silanizzante, soluzione al 10% di dimetildiclorosilano in toluene.

6.18 Agente desolforante

Sciogliere 9 g di solfito di sodio e 1 g di idrossido di sodio in un piccolo volume di acqua che viene poi estratta due volte con un piccolo volume di esano per rimuovere le eventuali sostanze organiche; aggiungere questa soluzione a 79 g di allumina basica e portare il peso finale a 100 g per essiccamento in modo da avere un contenuto finale di acqua pari all'11%.

6.19 Soluzioni di riferimento di pesticidi

I riferimenti dei pesticidi elencati in Tab. 1 debbono essere reperiti al più elevato grado di purezza (comunque >95%, considerando le eventuali correzioni da apportare ai calcoli per livelli di purezza inferiori al 98%). In generale é preferibile acquistare il principio attivo puro, piuttosto che sue soluzioni a concentrazione nota, essendo queste ultime generalmente meno stabili e più difficilmente conservabili a causa delle variazioni del volume di solvente. La purezza dei riferimenti deve essere controllata per via gascromatografica.

6.19.1 Soluzioni concentrate dei singoli pesticidi

Pesare circa 0,01 g di principio attivo puro e solubilizzarlo in n-esano portando a volume in un matraccio da 50 mL (concentrazione finale di circa 200 µg/mL). Le soluzioni devono essere conservate in frigorifero e le eventuali variazioni di volume del solvente possono essere controllate periodicamente per pesata. I pesticidi clororganici in genere restano inalterati per lunghi periodi (almeno 6 mesi).

6.19.2 Soluzioni diluite dei singoli pesticidi

Preparare dette soluzioni diluendo opportunamente le soluzioni concentrate (6.19.1) in modo da avere concentrazioni di circa 0,500 ng/µL, 0,100 ng/µL e 0,025 ng/µL.

6.19.3 Soluzioni di riferimento cumulative

In rapporto a particolari problemi delle varie fasi della procedura (purificazione e separazione, risoluzione gascromatografica) può essere utile preparare soluzioni di riferimento cumulative, diluendo opportunamente le soluzioni di cui ai Sottoparagrafi precedenti.
È preferibile preparare soluzioni cumulative a concentrazioni differenziate, in rapporto alla risposta specifica del rilevatore utilizzato ai vari principi attivi.

6.19.4 Soluzioni di riferimento diluite per prove di recupero

Per le prove di recupero, ai fini del controllo dell'intero procedimento, si debbono utilizzare soluzioni preparate in un solvente miscibile con acqua. Preparare queste soluzioni seguendo le modalità riportate nei Sottoparagrafi precedenti, utilizzando acetone.

7. Procedimento

7.1 Trattamento preliminare

Se il campione è stato refrigerato, prima dell'estrazione farlo equilibrare a temperatura ambiente. Controllare l'eventuale presenza di particelle in sospensione ed agitare per consentire la migliore omogeneità.

7.2 Estrazione

Trasferire 500 mL (od un volume minore) di campione in un imbuto separatore da 1 L, aggiungere 60 mL (ridurre a 20-30 mL se la quantità di campione prelevata è di 100 mL) di miscela di diclorometano/n-esano 15:85 (v/v) ed estrarre per 3 minuti con forte agitazione. Attendere la separazione tra le due fasi. Nel caso di formazione di emulsione, aggiungere una soluzione satura di cloruro di sodio (50-100 mL), agitare ed attendere; se la quantità di emulsione rimane comunque elevata (volume di emulsione pari ad un terzo della fase organica) centrifugare o filtrare su lana di vetro. Scaricare la fase acquosa (fase inferiore) in un secondo imbuto separatore e raccogliere la fase organica (fase superiore) per percolazione su sodio solfato anidro (circa 30 g) in un pallone da 250 mL. Ripetere l'estrazione con due successive aliquote di 60 mL di miscela diclorometano/n-esano 15:85 (v/v). Riunire le fasi organiche disidratate su sodio solfato anidro; lavare il sodio solfato con circa 20 mL di n-esano che vengono raccolti insieme alle altre fasi organiche. Concentrare a piccolo volume (circa 5 mL) mediante evaporatore rotante con bagno termostatico alla temperatura di 45°C e sotto vuoto moderato (400 mm Hg). Trasferire quantitativamente l'estratto in una provetta da concentrazione aiutandosi con circa 5 mL di esano per i lavaggi, aggiungere 1 mL di iso-ottano e concentrare sotto flusso di azoto a circa 2 mL per assicurare la completa eliminazione del diclorometano.

7.3 Purificazione

Di seguito sono descritte le tecniche di purificazione più idonee per l'eliminazione delle più probabili interferenze. L'analista dovrà decidere se sottoporre l'estratto ad una o più di una delle seguenti procedure. Si consiglia comunque di sottoporre sempre l'estratto alla ripartizione con acetonitrile.

7.3.1 Ripartizione con acetonitrile

Questa procedura è utilizzata per separare grassi ed oli dall'estratto.
Trasferire quantitativamente l'estratto in un imbuto separatore da 125 mL con un volume di n-esano sufficiente ad avere un volume finale nell'imbuto di 15 mL. Estrarre il campione per quattro volte con 30 mL di acetonitrile saturo di esano, agitando ogni volta vigorosamente per 1 minuto. Riunire le soluzioni di acetonitrile in un imbuto separatore da 1000 mL già contenente 700 mL di soluzione al 2% di NaCl. Miscelare ed estrarre con due aliquote successive di 100 mL di n-esano, agitando ogni volta.
Riunire gli estratti esanici in un imbuto separatore da 1000 mL e lavare con due porzioni successive di 100 mL di acqua distillata. Scartare le acque di lavaggio e disidratare l'esano su solfato di sodio anidro. Lavare l'imbuto separatore e il sodio solfato con tre porzioni di 10 mL di n-esano, riunendole all'estratto esanico. Concentrare in evaporatore rotante a volume noto (≤10 mL) ed analizzare in gascromatografia. Ridurre sotto flusso di azoto fino a 1 mL, se è necessario procedere alla purificazione successiva.

7.3.2 Rimozione dello zolfo elementare

È consigliabile adottare questa purificazione anche se si sospetta una interferenza molto lieve. Riempire una colonnina cromatografica (d.i. 7 mm) con 7 g di agente desolforante (6.18). Trasferire quantitativamente l'estratto concentrato nella colonnina ed eluire con 25 mL di esano. Concentrare in evaporatore rotante a volume noto (≤10 mL) ed analizzare in gascromatografia. Ridurre sotto flusso di azoto fino a 1 mL, se è necessario procedere alla purificazione successiva.

7.3.3 Cromatografia su gel di silice disattivato

La cromatografia su gel di silice viene effettuata per completare il procedimento di purificazione dell'estratto e per ottenere un frazionamento, anche se parziale, dei composti organoclorurati in due frazioni al fine di facilitare l'identificazione cromatografica. Lo schema generale di tale frazionamento è riportato in Tab. 2.

7.3.3.A Taratura dell'adsorbente

Prima di eseguire la cromatografia del campione, è indispensabile procedere alla taratura dell'adsorbente perché le caratteristiche possono variare ampiamente in relazione al tipo e al lotto di gel di silice. La taratura consiste nella definizione dei volumi di eluizione, utilizzando opportune soluzioni di riferimento dei pesticidi in esame, in modo da ottenere lo smistamento desiderato. I parametri indicati più avanti potranno dunque, dopo la fase di taratura dell'adsorbente, subire delle modifiche.

7.3.3.B Preparazione della colonna

Chiudere la parte inferiore della microcolonna (5.6.2) con un batuffolo di cotone sgrassato e versare nella colonna 2 g di gel di silice disattivato, in modo che la riempia fino ad una altezza di circa 20 cm (l'altezza è importante per la riproducibilità della separazione). Aggiungere un altro batuffolo di cotone sgrassato e uno strato di circa 1 cm di altezza di solfato di sodio anidro. Per il controllo dell'efficacia della colonna, senza prelavare il gel di silice aggiungere 1 mL di una soluzione di riferimento cumulativa (6.19.3), contenente i seguenti composti: aldrina, p,p'-DDT, p,p'-DDD e lindano.

Tabella 2: Schema generale di frazionamento dei pesticidi organoclorurati per cromatografia su gel di silice

	Eluato A (n-esano)	Eluato B (benzene/n-esano)
esaclorobenzene (HCB)	****	
(pentaclorobenzene)	****	
aldrina	****	
p,p'-DDE	****	
eptacloro	****	
o,p'-DDE	****	
o,p'-DDT	****	
p,p'-DDT	****	
pertane	****	
α-clordano	***	*
γ-clordano	***	*
o,p'-DDD	**	
p,p'-DDD	**	**
α-HCH	**	
β-HCH		****
γ-HCH (lindano)		****
δ-HCH		****
dicofol		****
eptacloro epossido		****
α-endosulfan		****
endrina		****
dieldrina		****
β-endosulfan		****

*Nota 1: per i composti che non sono eluiti in una singola frazione (****=100%), si deve considerare ***60-95%; **30-60%; *5-30%.*
Nota 2: i parametri di evaporazione (temperatura e vuoto) sono critici per ottenere recuperi soddisfacenti, poichè per codistillazione il recupero può scendere sotto il 50%.

Ciascun principio attivo dovrebbe essere ad una concentrazione di circa 0,1 ng/μL. Dopo adsorbimento, aggiungere 1 mL di esano (questa quantità serve per simulare il lavaggio del contenitore del campione). Dopo adsorbimento del solvente connettere il serbatoio alla colonna e quindi eluire, nell'ordine, con le seguenti miscele, cambiando il recipiente di raccolta quando il livello di un eluente raggiunge lo strato superiore del gel di silice:

- n-esano: 26 mL. Questa frazione deve contenere aldrina, p,p'-DDT e circa il 50% del p,p'-DDD;
- benzene/esano (60:40): 15 mL. Questa frazione deve contenere il residuo p,p'-DDD ed il lindano.

Il flusso degli eluenti deve essere di circa 1-2 mL/min e può essere ottenuto applicando una lieve pressione in testa alla colonna. Le due frazioni vengono concentrate con l'evaporatore rotante e sotto leggero vuoto, portate a volume noto con n-esano (<10 mL) ed analizzate in gascromatografia. Per l'eluizione del metossicloro e del captano occorre eluire con successivi 10 mL di benzene (frazione C).
È indispensabile che la taratura dell'adsorbente sia effettuata nel laboratorio dove normalmente vengono effettuate le analisi; la riproducibilità della separazione dipende infatti oltre che dall'attività dell'adsorbente e dalla purezza dei solventi, anche dalla temperatura e dall'umidità.

7.3.3.C Cromatografia del campione

Prima di procedere alla cromatografia, nel caso di campioni molto contaminati, l'estratto va

opportunamente diluito e la cromatografia su colonna effettuata su un'aliquota dello stesso. Usando la stessa tecnica utilizzata per la standardizzazione dell'adsorbente e nelle condizioni di disattivazione prima identificate, introdurre la soluzione del campione concentrato ad 1 mL nella microcolonna e far adsorbire. Quindi con 1 mL di esano lavare il contenitore del campione e introdurlo nella microcolonna. Eluire con i volumi più opportuni di n-esano e n-esano/benzene determinati nelle prove di taratura dell'adsorbente. Raccogliere separatamente le due frazioni e procedere secondo le modalità descritte per la standardizzazione dell'adsorbente. Eseguire l'analisi gascromatografica delle due frazioni per la determinazione dei pesticidi.

7.3.4 Cromatografia su gel di silice attivato

La prima frazione esanica proveniente dalla cromatografia su gel di silice disattivato può essere sottoposta a cromatografia su gel di silice attivato quando l'analisi gascromatografica mette in evidenza la presenza dei PCB oltre ai pesticidi clorurati.
Questa tecnica, sviluppata da Snyder e Reinert e modificata da Leoni, permette la separazione dei PCB dal DDT e DDE.

7.3.4.A Taratura dell'adsorbente

Nella colonna cromatografica, chiusa nella parte inferiore sfinata con un batuffolo di lana di quarzo, immettere 4 g di gel di silice attivato ricoprendoli quindi con n-pentano; chiudere con tappo a smeriglio e rovesciare più volte la colonna facendo infine depositare uniformemente l'adsorbente. Far percolare il solvente fino a circa 1 cm dal livello superiore dell'adsorbente e mettere nella colonna 1 mL di una soluzione in pentano di PCB e p,p'- DDE entrambi alla concentrazione di 5 μg/mL. Eluire la colonna nell'ordine con 140 mL di n-pentano e successivamente con 60 ml di benzene.
Concentrare i due eluati a un volume opportuno: all'analisi cromatografica i PCB e il p,p'-DDE si devono rinvenire rispettivamente negli eluati A e B.
Si richiama l'attenzione sul fatto che una buona preparazione della colonna è essenziale per la riproducibilità della separazione, in particolare deve essere evitata la formazione di bolle d'aria. L'efficienza della separazione è normalmente superiore al 90-95%. Se non si ottengono tali livelli di efficienza variare i volumi degli eluenti.

7.3.4.B Analisi del campione

Evaporare la soluzione in n-esano del campione, che contiene i pesticidi cloro-organici e i policlorodifenili (cioè proveniente dal primo gruppo di eluizione del gel di silice disattivato) fino a secchezza. Riprendere il residuo con un piccolo volume di n-pentano (2-3 mL) e quindi eseguire una cromatografia su gel di silice attivato nelle condizioni descritte in precedenza al punto A).
Nella prima frazione si possono rinvenire i pesticidi HCB, aldrina, eptacloro ed i PCB, mentre nella seconda frazione sono presenti i due isomeri del DDT e del DDE. I due eluati possono quindi essere analizzati con le tecniche gascromatografiche di seguito illustrate.

7.4 Determinazioni gascromatografiche

Si consiglia di utilizzare una colonna capillare con fase non polare ed un rivelatore a cattura di elettroni.

7.4.1 Caratteristiche cromatografiche delle colonne consigliate e relativi cromatogrammi

In Fig. 3 è riportato, a titolo di esempio, un cromatogramma di una soluzione di riferimento di pesticidi organoclorurati ottenuto con una delle colonne consigliate e le condizioni operative adottate. I tempi di ritenzione della maggior parte dei pesticidi di Tab. 1, ottenuti applicando le condizioni operative di Fig. 3, sono riportati in Tab. 3. Ovviamente, i dati riportati

sono indicativi e l'analista deve verificare i parametri con la strumentazione e le condizioni operative effettivamente utilizzate e inserire i tempi di ritenzione dei composti eventualmente mancanti sulla base dei riferimenti a disposizione.
Considerando l'elevato numero di composti organoclorurati presi in considerazione dal presente metodo e la variabilità delle prestazioni del rivelatore a cattura di elettroni si ritiene superfluo indicare i limiti di quantificazione per i singoli composti. D'altra parte, come già accennato, essi sono comunque abbondantemente sufficienti per il controllo delle acque di scarico in funzione dei limiti di legge esistenti. Per la verifica della riproducibilità della risposta del rivelatore, ripetere almeno tre volte l'iniezione di una sostanza di riferimento (esempio: aldrina).

7.4.2 Procedura per la taratura del rivelatore a cattura di elettroni

È necessario stabilire l'intervallo di linearità del rivelatore ed ottenere una curva di taratura per la verifica periodica della stabilità delle prestazioni del rivelatore e della stabilità delle soluzioni di lavoro. Per ogni composto da analizzare preparare soluzioni di lavoro ad almeno tre diverse concentrazioni. Le concentrazioni debbono essere tali che ad 1 µL di soluzione iniettato corrispondano quantità di pesticida comprese nell'intervallo 20-500 pg (questo è l'intervallo che può essere assunto preliminarmente come intervallo di linearità del rivelatore).
Costruire una curva di taratura, riportando in diagramma il fattore di taratura (rapporto tra area del picco e massa iniettata) in funzione delle quantità iniettate.
Stabilire l'intervallo di linearità di risposta del rivelatore (intervallo di massa di composto iniettato nel quale la curva ha un andamento parallelo all'asse delle ascisse). Per la verifica della stabilità delle condizioni gascromatografiche confermare quotidianamente l'andamento della curva di taratura con almeno una soluzione di riferimento diluita. Se la risposta varia da quella attesa più del 10%, il "test" deve essere ripetuto, utilizzando eventualmente soluzioni di riferimento diluite appena preparate. Altrimenti costruire una nuova curva di taratura.
Scelte le condizioni operative, controllata la stabilità strumentale e la sensibilità del rivelatore a cattura di elettroni, passare all'analisi gascromatografica del campione estratto opportunamente concentrato, in modo che i picchi delle sostanze da analizzare entrino nell'intervallo di linearità.
L'analisi qualitativa si basa sul confronto dei tempi di ritenzione, relativi ad una sostanza di riferimento, dei picchi presenti nei cromatogrammi del campione e delle soluzioni di riferimento, iniettati nelle stesse condizioni. La sostanza generalmente presa come riferimento è l'Aldrina. Soluzioni di riferimento e campione devono essere preparate nello stesso solvente. Se la complessità del cromatogramma del campione (elevato rumore di fondo e/o presenza di numerosi picchi e/o bande) non permette alcuna identificazione, adottare le opportune tecniche di eliminazione delle possibili sostanze interferenti.
Per l'analisi quantitativa procedere nel modo seguente.
Iniettare 1 µL di esano per verificare che non vi siano picchi dovuti a residui dalle precedenti iniezioni. Iniettare le soluzioni di riferimento relative ai composti identificati nel campione. La concentrazione del riferimento deve essere dello stesso ordine di grandezza di quella del composto nel campione. Iniettare, quindi, il campione e confrontare l'area relativa al singolo composto nel cromatogramma del campione con quella relativa allo stesso composto nel cromatogramma delle soluzioni di riferimento.

Tabella 3: Tempi di ritenzione relativi (RRT) all'aldrina di alcuni pesticidi clorurati

Composto	RRT
esaclorobenzene	
α-HCH	0,67
lindano	0,74
β-HCH	0,73
eptacloro	0,91
δ-HCH	0,80
aldrina	1,00 (18,76 minuti)
eptacloro epossido	1,11
δ-clordano	
o,p'- DDE	1,21
γ-clordano	
p,p'-DDE	1,30
dieldrina	1,29
o,p'-DDD	1,32
endrina	1,35
o,p'-DDT	1,42
p,p'-DDD	1,42
p,p'-DDT	1,54

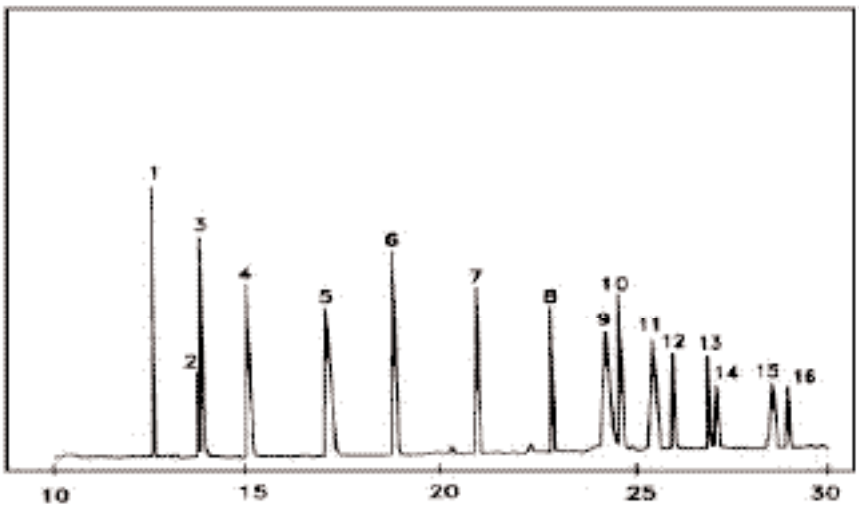


Figura 3: Colonna capillare SPB5, lunghezza: 25 m, d.i.: 0,2 mm, spessore del film: 0,25 µm. Condizioni cromatografiche utilizzate: temperatura iniettore 240°C ("splitless" 1 min); programma di temperatura 80°C per 2 min, quindi fino a 150°C a 15°C/min; 150°C per 1 min e fino a 260°C a 3°C/min; gas di trasporto elio. (1=α-HCH; 2=β-HCH; 3=γ-HCH, lindano; 4=δ-HCH; 5=eptacloro; 6=aldrina; 7=eptacloroepossido; 8=a-endosulfan ; 9=dieldrina; l0=p,p'-DDE; 11=endrina; 12=β-endosulfan; 13=p,p'-DDD; 14=endrina aldeide; 15=endosulfan solfato; 16=p,p'-DDT).

7.5 Analisi di conferma

7.5.1 Analisi gascromatografica su colonna a diversa polarità

Qualora siano stati identificati nel campione uno o più pesticidi clorurati dell'elenco di Tab. 1, è opportuno procedere ad un'analisi di conferma utilizzando una colonna con polarità diversa da quella utilizzata per l'analisi. Poichè nel metodo è stato suggerito l'uso di una colonna capillare con fase non polare (tipo SE-54), si può ripetere l'analisi per la conferma della identità dei picchi, utilizzando una delle colonne indicate nello schema del punto 5.4 come colonne capillari a media od alta polarità. Poichè sulla colonna di conferma l'ordine di eluizione è differente, si debbono controllare i tempi di ritenzione relativi ai picchi dei pesticidi clorurati identificati con la prima colonna e se, iniettando standard e campione sulla colonna di conferma, i picchi vengono confermati, si ritiene l'identificazione soddisfacente.

7.5.2 - Analisi gascromatografica con rivelatore di massa (GC/MS)

Il rivelatore di massa (GC/MS), costituisce un utilissimo mezzo di identificazione perchè la sua risposta è in relazione al peso molecolare ed alla struttura del composto. Per i dettagli di questa tecnica analitica si rimanda al metodo 5110.

8. Calcoli

Il calcolo della concentrazione di un generico pesticida organoclorurato "i", nel campione di acqua in esame si effettua applicando la seguente formula:

$$C_i = \frac{S \cdot A_c \cdot V_t}{A_i \cdot V_i \cdot V_c}$$

dove:
C_i = concentrazione (µg/L) del pesticida "i" identificato nel campione;
S = quantità (ng) di riferimento iniettato;

A_c = area del picco relativo al pesticida "i" nel campione*;
V_f = volume finale (µL) dell'estratto;
A_s = area del picco relativo al pesticida "i" nel riferimento*;
V_i = volume (µL) di estratto iniettato;
V_c = volume (mL) di campione sottoposto all'analisi (mL).

9. Qualità del dato

Prove di recupero effettuate utilizzando il metodo descritto hanno fornito, per l'intera procedura, recuperi superiori all'85% per tutti i composti organoclorurati presi in esame, con la sola eccezione dell'aldrina (recupero medio 79% ± 6,7%, su 5 prove). Per quanto riguarda alcuni composti (esempio esaclorobenzene ed HCH) l'utilizzazione di condizioni drastiche (vuoto spinto e temperatura >45°C) nelle fasi di concentrazione del campione possono portare a recuperi non soddisfacenti.

Nota: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".*
Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

BIBLIOGRAFIA

AHNOFF M. & JOSEFSSON B. (1975): "Cleanup procedures for PCB analysis on river extracts", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.,* **13**, 159.

ARMOUR J.A. & BURKE J.A. (1970): "Method for separating polychlorobiphenyls from DDT and its analogs", *J. Assoc. 0ff Anal. Chem.*, **53**, 761.

BIDLEMAN T.F., MATTEWS J.R. & OLNEY C.E. (1978): "Separation of polychlorinated biphenyls, chlordane and p,p'-DDT from toxaphene by silicic acid column chromatography", *J. Assoc. 0ff. Anal. Chem.,* **61**, 820.

BLUMER M. (1957): "Removal of elemental sulfur from hydrocarbon fractions", *Anal. Chem.,* **29**, 1039.

Decreto Legislativo 152/99, Disposizioni sulla tutela delle acque dall'inquinamento e recepimento della direttiva 91/271/CEE concernente il trattamento delle acque reflue urbane e della direttiva 91/676/CEE relativa alla protezione delle acque dall'inquinamento provocato dai nitrati provenienti da fonti agricole, *G.U. n. 124, 29 maggio 1999, Supplemento Ordinario n. 101/L.*

ERNEY D.R. (1974): "Silica gel microcolums for the separation of some polychlorinated biphenyls, DDT, and analogs", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.,* **12**, 542.

GOERLITZ D.F. & LAW L.M. (1971): "Note on removal of sulfur interferences from sediment extracts for pesticide analysis", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **6**, 9.

*le aree saranno espresse in unità di misura convenzionali fornite dall'integratore.

HERNANDEZ HERNANDEZ F., LOPEZ BENET F.J., MEDINA ESCRICHE J. & BARBERA UBEDA J.C. (1987): "Sulfuric acid cleanup and KOH-Ethanol treatment for confirmation of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls: application to wastewater samples", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**, 727.

LEONI V. (1971): "The separation of fifty pesticides and related compounds and polychlorobiphenyls into four groups by silica gel microcolumn chromatography", *J. Chromatogr.*, **62**, 63.

JAPENGA J., WAGENAAR W.J., SMEDES F. & SALOMONS W. (1987): "A new, rapid cleanup procedure for the simultaneous determination of different groups of organic micropollutants in sediments; application in two European estuarine sediment studies", *Environ. Technol. Lett.*, **8**, 9.

JENSEN S., RENBERG L. & REUTERGARDH L. (1977): "Residue analysis of sediment and sewage sludge for organochlorines in the presence of elemental sulfur", *Anal. Chem.*, **49**, 316.

LAWRENCE J., TOSINE H.M. & HELLE M. (1977): "Polychlorinated biphenyl concentrations in sewage and sludges of some waste treatment plants in southern Ontario", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **17** , 49.

LEONI V., CREMISINI C., CASUCCIO A. & GULLOTTI A. (1991): "The separation of pesticides and related compounds, polychlorobiphenyls and other pollutants into four groups by silica gel microcolumn chromatography (Application to surface water analysis)", *Pestic. Sci.*, **31**, 209-220.

REYNOLDS L.M. & COOPER T. (1975): *"Analysis of organochlorine residues in fish, Water Quality Parameters",* ASTM STP 573, American Society for Testing and Materials, Philadelphia.

SCHUTZMANN R.L., WOODHAM D.W. & COLLIER C.W. (1971): "Removal of sulfur in environmental samples prior to gas cbromatographic analysis for pesticide residues", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **54**, 1117.

SNYDER D. & REINERT R. (1971): "Rapid separation of polichlorinated biphenyls from DDT and its analogues on silica gel", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **6**, 385.

TEICHMAN J., BEVENUE A. & HYLIN J.W. (1978): "Separation of polychlorobiphenyls from chlorinated pesticides in sediment and oyster samples for analysis by gas chromatography", *J. Chromatogr.*, **151**, 155.

TELLING C.M., SISSION D.J. & BRINKMAN M.W. (1977): "Determination of organochlorine insecticide residues in fatty foodstuff using a clean-up technique based on a single column of activated alumina", *J. Chromatogr.*, **137**, 405.

THOMPSON J.F., (1977). "*Analysis of Pesticide Residues in Human and Environmental Samples*", revision, U.S. Environmental Protection Agency, Research Triangle Park, N.C.

U.S. Environmental Protection Agency (EPA): "Method 617: *The Determination of Organohalide Pesticides and PCBs in Municipal and Industrial Wastewater*".

ZITKO V. (1971): "Effects of pesticides-grade hexanes on the silicic acid chromatography of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides", *J. Chromatogr.*, **59**, 144.

5100. Pesticidi fosforati

I pesticidi fosforati sono una classe di pesticidi caratterizzati dalla presenza di un gruppo fosforico nella molecola variamente sostituito (alchil e/o aril fosfati, pirofosfati, tiofosfati e ditiofosfati). Sono composti facilmente degradabili, soprattutto per via idrolitica. Nonostante ciò non si possono escludere per alcuni di loro fenomeni di persistenza nell'ambiente. Infatti esteri fosforici e loro derivati sono stati ripetutamente identificati anche nelle acque superficiali sia in Italia che in altri paesi. Caratteristiche quali solubilità e persistenza possono variare notevolmente tra i composti appartenenti a questa classe.
Il metodo descritto riguarda la determinazione in acque di scarico di pesticidi organofosforici di largo impiego e può anche essere esteso ad alcuni dei loro prodotti di degradazione nonché ad altri prodotti strutturalmente correlati non impiegati come pesticidi.
La necessità di un unico metodo per più principi attivi ha portato alla scelta di condizioni operative soddisfacenti per tutti i composti presi in considerazione, pur se per i singoli composti possono esistere alternative procedurali più efficienti. Qualora si conosca in anticipo il composto da determinare si può quindi adottare un metodo di riferimento, se disponibile in letteratura.
Le concentrazioni massime ammesse nelle acque dalla normativa vigente condizionano, in relazione al limite di quantificazione del metodo, il volume di campione da sottoporre ad analisi ed anche il volume finale a cui concentrare l'estratto. Per le acque di scarico, il limite di legge posto a 0,1 mg/L (Tab. 3, All. 5 del D.Lgs. 152/99) consentirebbe di eseguire l'analisi su piccoli volumi di campione (pochi millilitri); d'altra parte l'esigenza di un campione rappresentativo suggerisce di operare comunque su volumi maggiori.
Informazioni preliminari sui livelli dei composti nel campione, riferite eventualmente a precedenti analisi nello stesso sito di campionamento, possono aiutare nel determinare la quantità di campione da sottoporre all'analisi e il volume finale al quale l'estratto deve essere concentrato. Allo scopo di determinare concentrazioni dell'ordine dei µg/L si consiglia di utilizzare 100-500 mL di campione di acqua.
Ulteriori considerazioni possono essere fatte per quanto concerne la necessità di operare tecniche di purificazione dell'estratto in funzione delle impurezze presenti nel campione. Ovviamente nei campioni di acque di scarico sono potenzialmente presenti molte impurezze e possono essere necessarie tecniche specifiche di purificazione. Nel metodo vengono suggerite tecniche di purificazione dell'estratto in funzione delle eventuali interferenze presenti nel campione. Sono descritte tecniche di ripartizione n-esano/acetonitrile, cromatografia su colonna di allumina, cromatografia e frazionamento su colonna di gel di silice.
In ogni caso, per ridurre la possibilità di errore, l'applicazione dei procedimenti descritti richiede personale lungamente addestrato a questo tipo di determinazioni e l'effettuazione di frequenti controlli di qualità. Nel metodo sono descritte tecniche di conferma basate sul preliminare frazionamento su gel di silice e sull'uso di differenti condizioni gascromatografiche (colonne a diversa polarità e diversi rivelatori). In particolare per le analisi di conferma è consigliato l'uso, se disponibile in laboratorio, di un rivelatore di massa.

1. Principio del metodo

Il metodo presenta alcune alternative procedurali, che l'analista può scegliere in rapporto al tipo e quantità delle interferenze e alla presenza di uno o più pesticidi organofosforici nel campione.
In particolare il metodo consiste in una estrazione liquido-liquido con diclorometano, con-

centrazione dell'estratto organico ed analisi gascromatografica. In caso di presenza di sostanze interferenti si può procedere ad una purificazione dell'estratto mediante ripartizione n-esano/acetonitrile e/o una cromatografia su opportuno adsorbente (allumina o gel di silice).
Non è stata presa in considerazione la tecnica di estrazione solido-liquido, pure se molto utilizzata ed in grado di fornire ottimi risultati. Tale scelta è stata motivata dal fatto che le analisi per le acque di scarico debbono essere eseguite sul campione tal quale, senza filtrazione preliminare. La presenza di particolato in sospensione può ridurre l'efficienza estrattiva dei materiali solitamente utilizzati ed, in alcuni casi, può dar luogo a recuperi non soddisfacenti. L'operatore può comunque stabilire, caso per caso, se esistono i presupposti per una corretta utilizzazione di tale tecnica.
La determinazione gascromatografica è realizzata mediante un rivelatore fotometrico a fiamma selettivo per il fosforo, che praticamente elimina tutte le interferenze, non contenenti fosforo, eventualmente presenti. Questo rivelatore è identificato dalla sigla FPD (Flame Fotometric Detector).
L'uso di un rivelatore a ionizzazione di fiamma modificato con sali di metalli alcalini, selettivo verso il fosforo e l'azoto, può essere utile. Infatti questo rivelatore generalmente consente di raggiungere limiti inferiori di determinazione rispetto all'FPD ed inoltre il confronto delle risposte dei due rivelatori, pur richiedendo un difficile lavoro di taratura da effettuare ogni volta prima dell'analisi, potrebbe fornire utili informazioni per la conferma dell'identità del composto. Il rivelatore a ionizzazione di fiamma, comunemente detto azoto/fosforo è identificato dalla sigla NPD (Nitrogen Phosphorus Detector) o TSD (Thermionic Specific Detector).
Si sconsiglia l'uso del rivelatore a cattura di elettroni (ECD) per la sua scarsa selettività, e per l'intervallo di linearità ridotto.
La disponibilità di un rivelatore di massa (MS), operante in SIM (Single Ion Monitoring) permette un'ulteriore più sicura identificazione della sostanza.
Per quanto riguarda le colonne gascromatografiche, si consiglia l'uso di colonne con fase stazionaria non polare e a polarità intermedia. Nel metodo vengono suggerite alcune possibilità di scelta tra le colonne commercialmente disponibili e di uso più frequente. L'analisi qualitativa si basa sul confronto dei tempi di ritenzione dei picchi osservati nel campione con quelli di idonee miscele di riferimento. L'uso di colonne con fase stazionaria a diversa polarità è utile per la conferma qualitativa dei composti.
L'analisi quantitativa è realizzata per confronto delle aree dei picchi dei campioni con quelli ottenuti da soluzioni di riferimento. I risultati sono di norma espressi in microgrammi per litro (µg/L).

2. Campo di applicazione

Con il presente metodo, utilizzando le tecniche di estrazione e concentrazione dell'estratto di seguito indicate, possono essere determinati pesticidi organofosforici e loro metaboliti presenti nel campione a livello di pochi microgrammi per litro (per la maggior parte dei composti il limite di quantificazione è ≤1 µg/L). Questo limite di quantificazione è ampiamente adeguato alla normativa vigente (Tab. 3, All. 5 del D.Lgs. 152/99), che stabilisce un limite di 0,1 mg/L per le acque di scarico.
Concentrazioni inferiori al µg/L, fino a 1 ng/L, possono essere dosate variando opportunamente il volume di acqua da estrarre, il volume finale dell'estratto ed il volume dell'estratto iniettato nel gascromatografo.
Il procedimento è applicabile ai principali pesticidi organofosforici oggi utilizzati in Italia (Tab. 1). Esso può essere esteso, previa sperimentazione, ad altri principi e loro metaboliti.

Tabella 1: Pesticidi fosforati

Composti	Composti
Azinfos-etile	Etion
Azinfos-metile	Fenitrotion
Bromofos	Fosalone
Clorfenvinfos E	Malaoxon
Clorfenvinfos Z	Malation
Clorpirifos	Metidation
Clorpirifos-metile	Paraoxon
Demeton-O	Paraoxon-metile
Demeton-S-metile	Paration
Demeton-S-metil solfone	Paration-metile
Diazinone	Pirimifos-metile
Dimetoato	Tetraclorvinfos
Eptenofos	Vamidotion

3. Interferenze e cause di errore

Solventi e reagenti, vetreria, l'eventuale contaminazione dell'ambiente di lavoro ed ogni trattamento del campione possono causare problemi e portare alla presenza di picchi interferenti nei cromatogrammi e/o alterazioni della corrente di fondo dei rivelatori con conseguenti difficoltà di interpretazione e/o interpretazioni errate del tracciato gascromatografico. Tutti i materiali utilizzati pertanto devono essere esenti da interferenze nelle condizioni operative adottate. È quindi buona norma di laboratorio, all'inizio dell'indagine e periodicamente, sottoporre all'intera procedura uno o più "bianchi" sostituendo al campione acqua distillata. Nel caso di presenza di interferenze, individuarne la provenienza, analizzando ogni singolo passaggio della procedura e procedere alla loro eliminazione. Può essere richiesta una specifica selezione dei reattivi ed una purificazione dei solventi per mezzo di distillazione.
Le interferenze presenti negli effluenti industriali sono spesso non trascurabili e di varia natura e possono causare difficoltà nell'ottenere misure precise ed accurate. Quando, nel caso di analisi gascromatografica diretta dell'estratto organico del campione, l'ammontare complessivo delle sostanze interferenti supera le caratteristiche di specificità proprie dei rivelatori, è necessario procedere alla purificazione dell'estratto, tenendo presente che questa fase può implicare perdite di alcuni pesticidi organofosforici. Non essendo possibile indicare tutte le procedure per eliminare ogni possibile sostanza interferente presente nelle acque reflue, sono indicate qui alcune tra le più efficienti. Ovviamente, per quanto sopra accennato, la tecnica di purificazione deve essere verificata di volta in volta su soluzioni di riferimento dei singoli composti, per accertare che non si verifichino perdite significative dell'analita.
Pesticidi organoclorurati, policlorobifenili e ftalati, che rappresentano classiche interferenze nella determinazione dei pesticidi organofosforici quando si usa un rivelatore a cattura di elettroni, sono praticamente eliminate dall'uso del rivelatore FPD.

4. Campionamento e conservazione del campione

I campioni vanno prelevati in bottiglie di vetro neutro, possibilmente scuro, della capacità di 1 litro con chiusura a smeriglio oppure a vite. Prima del riempimento le bottiglie devono essere risciacquate con la stessa acqua che si desidera campionare. È consigliabile evitare l'uso di qualsiasi dispositivo in plastica. È buona norma prelevare due aliquote per ciascun campione. I campioni dovrebbero essere analizzati quanto prima possibile perché gli esteri fosforici possono non essere stabili in soluzione acquosa, soprattutto se alcalina. Aggiungere al campione acido solforico concentrato (1:1) o idrossido di sodio 1 M fino a pH 6,5-7,5 (eventualmente portare a pH 7 con 50 mL di tampone fosfato (6.13) e conservare in frigorifero per

non più di due giorni. Se nel campione è sospettata la presenza di diazinone, l'estrazione va eseguita immediatamente a causa della elevata instabilità del composto in acqua.
Se è necessario conservare il campione per un lungo periodo, al fine di bloccare qualsiasi eventuale attività biologica, al campione possono essere aggiunte sostanze battericide qualora sia stata preventivamente accertata la loro efficacia e la loro non interferenza con l'analisi.
Per maggiori dettagli sul campionamento si può fare riferimento alla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".

5. Apparecchiature

5.1 *Gascromatografo* che consenta l'impiego di colonne capillari.

5.2 *Rivelatori*

Fotometrico a fiamma (FPD) con filtro per il fosforo (λ=526 nm) e per lo zolfo (λ=394 nm). È consigliabile inoltre l'uso di un rivelatore azoto/fosforo (NPD) e, se disponibile, può essere molto utile un rivelatore di massa (MS) operante in SIM soprattutto per le analisi di conferma.

5.3 *Sistema di acquisizione ed elaborazione dei dati cromatografici*

5.4 *Colonne gascromatografiche*

Le colonne e le fasi stazionarie consigliate per l'analisi dei pesticidi organofosforati sono descritte nello schema seguente. Si consiglia di utilizzare colonne con rapporto di fase (raggio/2 x spessore di fase) di circa 250 e di lunghezza non inferiore a 30 m.
Per prove di conferma è utile disporre di colonne con fase stazionaria a diversa polarità.

Fase stazionaria	Nomi commerciali fase/colonna
Non polare	
metil silicone	SE-30, DB-1 *od equivalenti*
5%fenile + 95%metil silicone	SPB-5, DB-5, SE-54, ULTRA-2 *o equivalenti*
Media polarità	
14% cianopropilfenil silicone	OV-1701, SPB-1701, DB 1701 *o equivalenti*
50% fenile + 50% metil silicone	OV-17, SP-2250, DB-17 *o equivalenti*

5.5 *Evaporatore rotante* con possibilità di operare con il vuoto, con bagno termostatico e adatto sistema per il recupero dei solventi.

5.6 *Vetreria*

5.6.1 Colonna in vetro per disidratazione su solfato di sodio anidro (lunghezza 10 cm; 3,5 cm d.i.) senza setto poroso, con gambo sfinato (10 mm d.i.). Il setto poroso è sostituito da un piccolo batuffolo di cotone sgrassato, opportunamente inserito nel punto di restringimento in fondo alla colonna. In alternativa si possono utilizzare le colonne per la disidratazione in accordo con le specifiche EPA (serbatoio per 60 mL di estratto, colonna 10 cm x 2 cm d.i., gambo sfinato 8 mm d.i., vedi Fig. 1).

5.6.2 Microcolonna in vetro 30 cm x 4,2 mm d.i. (con estremità superiore munita di smeriglio per il collegamento con un serbatoio per l'eluente), per la cromatografia su gel di silice (Fig. 2).

5.6.3 Fiale o provette (preferibilmente con gambo sfinato) da concentrazione in vetro da 2 mL, 5 mL, 10 mL, 15 mL e 25 mL.

5.6.4 Imbuti separatori da 125 mL, 500 mL e 1000 mL, muniti di tappo a smeriglio e rubinetto in teflon.

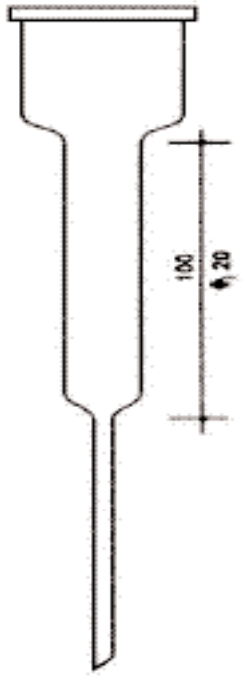


Figura 1: Colonna per disidratazione secondo le specifiche EPA (le misure sono espresse in mm).

5.6.5 Palloni (preferibilmente a cuore) con cono smeriglio adatto per l'evaporatore rotante, di cui al punto 5.5, aventi capacità 50 mL, 100 mL e 250 mL.

5.6.6 Matracci tarati con tappo smeriglio da 10 mL, 100 mL e 1000 mL.

5.6.7 Pipette tarate (volumi da 0,5 mL a 10 mL).

5.6.8 Altra vetreria normalmente in dotazione in qualsiasi laboratorio chimico (beute con tappo smeriglio, cilindri graduati, imbuti, pipette Pasteur).

5.7 Microsirighe per gascromatografia (tipo Hamilton o equivalenti) aventi capacità di 5 µL e 10 µL.

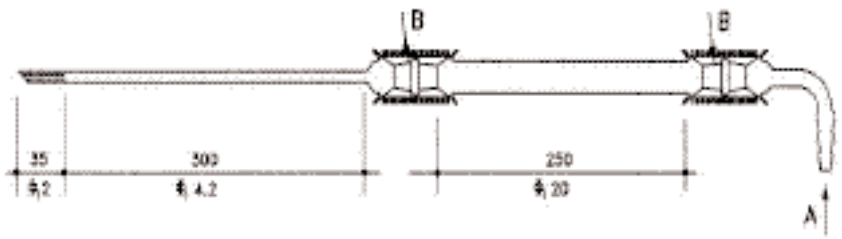


Figura 2: Microcolonna per la separazione di pesticidi ed altri composti in quattro gruppi. A, ingresso aria per ottenere una leggera pressione; B, giunto 10/19 (le misure sono espresse in mm).

5.8 Microsiringhe per dosaggio di liquidi (tipo Hamilton o equivalenti per HPLC) da 25 µL, 50 µL, 100 µL, 250 µL e 500 µL.

5.9 Bilancia analitica, risoluzione 0,1 mg.

6. Reattivi

Tutti i solventi, a meno che non siano specificatamente dichiarati "per analisi di pesticidi" vanno sottoposti a purificazione mediante distillazione con apparecchiature "tutto vetro". È consigliabile che per ogni solvente si disponga di una apposita apparecchiatura di distillazione. Tutti i solventi vanno comunque controllati prima di essere utilizzati, usando le quantità impiegate nella procedura e concentrando al volume finale indicato in procedura. Analogamente è sempre consigliato l'uso di reattivi specificatamente dichiarati per "analisi di pesticidi".

6.1 n-Esano "per analisi pesticidi"

6.2 Diclorometano "per analisi pesticidi"

6.3 Acetonitrile "per analisi pesticidi"

6.4 Benzene "per analisi pesticidi"

6.5 Acetato di etile "per analisi pesticidi"

6.6 Alcool metilico "per analisi pesticidi"

6.7 Acetone "per analisi pesticidi"

6.8 Acqua distillata

Esente da sostanze organiche che possano interferire nelle analisi (esempio: acqua distillata trattata su sistemi dotati di apposita cartuccia in carbone attivo). L'acqua deve essere controllata con una prova di "bianco".

6.9 Soluzione di idrossido di sodio 1 M

Pesare 40 g di idrossido di sodio e scioglierli in acqua distillata (6.8), portando a volume con acqua distillata in matraccio tarato da 1 L.

6.10 Soluzione di acido solforico concentrato 1:1 (v/v), in acqua distillata (6.8)

6.11 Solfato di sodio granulare anidro trattato in muffola a 450°C per almeno 4 ore; conservare in recipiente di vetro ermeticamente chiuso.

6.12 Soluzione satura di cloruro di sodio (trattato preventivamente in muffola a 450°C per almeno 4 ore e lasciato raffreddare) in acqua distillata (6.8).

6.13 Soluzione tampone fosfato (pH=7)

Preparare la soluzione mescolando 29,6 mL di HCl 0,1 M e 50 mL di K_2HPO_4 0,1 M.

6.14 Cotone sgrassato in Soxhlet con n-esano/acetone 1:1 (v/v) per 6 ore e lasciato asciugare. Conservare in recipiente di vetro chiuso.

6.15 Allumina neutra grado I, attivata a 130°C per 2 ore e, dopo raffreddamento, disattivata con acqua distillata al 5% (p/p).

La disattivazione è effettuata trasferendo 1 mL di acqua distillata in una beuta da 125 mL con tappo a smeriglio e distribuendo l'acqua sulle pareti, ruotando la beuta. Aggiungere immediatamente 19 g di allumina ed agitare la beuta per almeno 20 minuti.

6.16 Gel di silice (100/200 mesh), disattivato mediante aggiunta di acqua distillata (6.8) al 6,5% (p/p).

La disattivazione è effettuata nel seguente modo: a 25 g di gel di silice (trattato a 200°C per 8 ore e conservato in beuta con tappo a smeriglio posta in essiccatore in presenza di agenti essiccanti) contenuti in una beuta, addizionare la giusta quantità di acqua distillata determinata in base ai risultati di prove di taratura dell'adsorbente condotte come descritto nel Sottoparagrafo 7.3.3 A. L'aggiunta viene effettuata goccia a goccia sotto costante agitazione. Agitare poi per 20 minuti e lasciare riposare una notte prima dell'uso. Conservare in recipiente ermeticamente chiuso, ma non in presenza di agenti essiccanti. Il gel così preparato conserva le sue caratteristiche per circa una settimana.

6.17 Lana di vetro silanizzata

6.18 Agente silanizzante

Soluzione al 10% di dimetildiclorosilano in toluene.

6.19 Soluzioni di riferimento

I riferimenti dei pesticidi riportati in Tab. 1 debbono essere reperiti al più elevato grado di purezza possibile (comunque >95%, considerando le eventuali correzioni da apportare ai calcoli per livelli di purezza inferiori al 98%). In generale è preferibile acquistare il principio attivo puro a titolo noto, piuttosto che sue soluzioni a concentrazione nota, essendo queste ultime, generalmente, meno stabili. La purezza dei riferimenti deve essere controllata (ad esempio per via gascromatografica) prima delle analisi.

6.19.1 Soluzioni di riferimento concentrate dei singoli pesticidi

Pesare 0,01 g di principio attivo puro e scioglierlo in acetato d'etile, portando poi a volume in matraccio tarato da 10 mL (concentrazione finale di circa 1000 µg/mL). In alternativa, si può solubilizzare il principio attivo in esano o esano con l'aggiunta di qualche goccia di benzene, se la solubilizzazione nel solo esano è difficoltosa. Nella preparazione delle soluzioni di riferimento utilizzare tutte le cautele consigliate per la manipolazione di sostanze altamente tossiche. Le soluzioni di riferimento così ottenute vanno conservate al buio ed in frigorifero, controllandole periodicamente e comunque prima dell'analisi.

6.19.2 Soluzioni diluite dei singoli pesticidi

Preparare tali soluzioni diluendo opportunamente, con lo stesso solvente, le soluzioni concentrate (6.19.1), in modo da avere concentrazioni di 10 µg/mL, 1 µg/mL e 0,1 µg/mL.

6.19.3 Soluzioni di riferimento cumulative

In rapporto a particolari problemi di separazione gascromatografica può essere utile preparare delle soluzioni cumulative, contenenti più principi attivi. Preparare le soluzioni diluendo opportunamente le soluzioni (6.19.1 e 6.19.2), ma preferibilmente a concentrazioni differenziate, in rapporto alla risposta dei vari principi attivi al rivelatore utilizzato.

6.19.4 Soluzioni di riferimento per le prove di recupero

Per le prove di recupero si debbono utilizzare riferimenti in un solvente miscibile con acqua. Si possono preparare queste soluzioni con le stesse procedure descritte in (6.19.1, 6.19.2, 6.19.3) utilizzando acetone o alcool etilico.
Per prove di recupero su tutti i pesticidi organofosforici considerati in Tab. 1, si consiglia di preparare due o più soluzioni di riferimento cumulative, miscelando i singoli principi attivi sul-

la base dei loro tempi di ritenzione (riportati in Tab. 2) allo scopo di evitare nei gascromatogrammi sovrapposizioni di picchi non risolti (vedi la composizione delle miscele riportate nei gascromatogrammi descritti più avanti).

Tabella 2: Tempi di ritenzione relativi ($tr_{paration\text{-}metile}$ = 1) dei pesticidi organofosforici determinati con una colonna SPB-5 adottando le condizioni operative descritte in Fig. 3

Composti	Tr (paration-metile)
Acefate	0,26
Azinfos-etile	2,29
Azinfos-metile	2,16
Bromofos	1,24
Clorfenvinfos E	1,31
Clorfenvinfos Z	1,35
Clorpirifos	1,18
Clorpirifos-metile	0,99
Demeton-O	0,48
Demeton-S-metile	0,49
Demeton-S-metilsolfone	1,09
Diazinone	0,84
Dimetoato	0,69
Eptenofos	0,42
Etion	1,73
Fenitrotion	1,11
Fosalone	2,20
Malaoxon	1,03
Malation	1,16
Metamidofos	0,09
Metidation	1,40
Monocrotofos	0,64
Ometoato	0,48
Paraoxon	1,06
Paraoxon-metile	0,85
Paration	1,19
Paration-metile	1(9,20 min)
Pirimifos-metile	1,11
Tetraclorfenvinfos	1,45
Vamidotion	1,45

6.19.5 Soluzioni di riferimento per la cromatografia su gel di silice

Preparare una soluzione di riferimento con i principi attivi che interessano ad una concentrazione di circa 0,1 µg/mL in esano.

7. Procedimento

7.1 Trattamento preliminare

Attendere che il campione raggiunga la temperatura ambiente, se conservato in frigorifero. Controllare l'eventuale presenza di particelle in sospensione ed agitare per consentire la migliore omogeneità. Controllare che il pH sia nell'intervallo 6,5-7,5 (eventualmente portare a pH=7 con 50 mL di tampone fosfato, 6.13).

7.2 Estrazione

Trasferire 500 mL di campione in un imbuto separatore da 1 L, aggiungere 75 mL di diclorometano e 100 mL di soluzione satura di cloruro di sodio. L'aggiunta del cloruro di sodio diminuisce il rischio di formazione di emulsioni e aumenta la solubilità dei composti più polari nella fase organica. Estrarre per 3 minuti con forte agitazione. Attendere la completa separazione delle due fasi e raccogliere la fase organica (fase inferiore), per percolazione su sodio solfato anidro (circa 30 g, per la colonna di disidratazione vedi 5.6.1) in una beuta. Ripetere l'estrazione con due successive aliquote di 60 mL di diclorometano. Lavare il sodio solfato con circa 20 mL di diclorometano che vengono raccolti insieme alle altre fasi organiche. Concentrare a piccolo volume (circa 2-3 mL) mediante evaporatore rotante con bagno termostatico a temperatura ≤45°C e sotto vuoto moderato (400 mm Hg). Se si procede all'analisi gascromatografica diretta, senza alcuna purificazione, trasferire quantitativamente il residuo in provetta utilizzando per i lavaggi circa 5 mL di acetato d'etile e ridurre il volume, sotto corrente di azoto, sino a completa eliminazione del diclorometano. Portare a volume noto (1-5 mL) con acetato d'etile ed analizzare in gascromatografia con rivelatore FPD. Se si utilizza un volume di campione inferiore a 400 mL aggiungere al campione acqua distillata fino ad un volume di 500 mL e procedere all'estrazione come sopra descritto.

7.3 Purificazione

Nel caso l'analista giudichi necessaria la purificazione dell'estratto, sottoporre l'estratto ad una o più delle seguenti procedure.

7.3.1 Ripartizione n-esano/acetonitrile

Questa procedura è utilizzata per separare grassi e oli dall'estratto. Non tutti i pesticidi organofosforici sono recuperati quantitativamente con questa procedura. L'analista deve provare preventivamente l'efficienza della ripartizione operando con riferimenti dei singoli pesticidi. In questo caso non si effettua il cambio di solvente esano-acetato di etile. Trasferire quantitativamente l'estratto esanico del campione in un imbuto separatore da 125 mL, lavando con n-esano fino ad un volume finale di 15 mL. Estrarre 4 volte il campione con porzioni di 30 mL di acetonitrile, saturo di n-esano, agitando ogni volta vigorosamente per 1 minuto. Riunire gli estratti acetonitrilici in un imbuto separatore da 1 L, aggiungere 650 mL di acqua distillata (6.8) e 40 mL di soluzione satura di cloruro di sodio (6.12). Mescolare per 30-40 secondi ed estrarre due volte con 100 mL di n-esano agitando vigorosamente per circa 15 secondi. Riunire gli estratti esanici in imbuto separatore da 1 L e lavare con due porzioni di 100 mL di acqua distillata. Scartare lo strato acquoso ed asciugare la fase esanica su solfato di sodio (per la colonna di disidratazione vedi 5.6.1), raccogliendo 1'eluato in pallone da 500 mL. Lavare l'imbuto separatore e la colonna con tre porzioni di 10 mL di esano. Riunire gli estratti ed i lavaggi e concentrare a piccolo volume (2-3 mL) mediante evaporatore rotante con bagno termostatico a temperatura ≤45°C e sotto vuoto moderato (400 mm Hg). Se si procede all'analisi gascromatografica, senza ulteriore purificazione, trasferire quantitativamente il residuo in provetta utilizzando per i lavaggi circa 5 mL di acetato d'etile e ridurre il volume sotto corrente di azoto. Portare a volume noto (1-5 mL) con acetato d'etile ed analizzare quindi in gascromatografia con rivelatore FPD.

7.3.2 Rimozione dello zolfo elementare

Questa purificazione può essere necessaria qualora si intenda procedere ad analisi di conferma che prevedono l'uso di rivelatori per i quali la presenza di zolfo elementare rappresenta una seria interferenza (rivelatore fotometrico con filtro selettivo per lo zolfo, rivelatore di massa). È consigliabile comunque eseguire sempre questa purificazione in presenza di quantità notevoli di zolfo elementare. Preparare una microcolonna di adsorbimento utilizzando una pipetta di tipo Pasteur, inserendo sul fondo un piccolo batuffolo di lana di vetro. Riempire con allumina (6.15) sino ad una altezza di 3 cm e dopo assestamento ricoprire con

1 cm di solfato di sodio anidro. Concentrare l'estratto a piccolo volume (circa 2-3 mL) mediante evaporatore rotante con bagno termostatico a temperatura ≤45°C e sotto vuoto leggero (400 mm Hg). Trasferire quantitativamente il residuo in provetta aiutandosi con circa 5 mL di esano e portare a circa 0,5 mL sotto corrente di azoto. Trasferire quantitativamente l'estratto esanico sulla colonna ed eluire con 3 mL di n-esano, scartando questo eluato. Di seguito proseguire l'eluizione con 5 mL di una miscela di n-esano/diclorometano 1:9 (v/v), raccogliendo l'eluato in provetta graduata. Concentrare a circa 1 mL sotto corrente di azoto. Se si procede all'analisi gascromatografica, senza ulteriore purificazione, aggiungere circa 5 mL di acetato d'etile e ridurre il volume, sotto corrente di azoto, sino a completa eliminazione del diclorometano/esano. Portare a volume noto (1-5 mL) con acetato d'etile ed analizzare in gascromatografia con rivelatore FPD.

7.3.3 Cromatografia su gel di silice disattivato al 6,5%

7.3.3.A Taratura dell'adsorbente

Prima di eseguire la cromatografia del campione, è indispensabile procedere alla taratura dell'adsorbente perché le caratteristiche possono variare ampiamente in relazione al tipo e al lotto di gel di silice. La taratura consiste nella definizione dei volumi di eluizione, utilizzando opportune soluzioni di riferimento dei pesticidi in esame, in modo da ottenere lo smistamento desiderato. I parametri indicati più avanti potranno dunque, dopo la fase di taratura dell'adsorbente, subire delle modifiche.

7.3.3.B Preparazione della colonna

Chiudere la parte inferiore della microcolonna (5.6.2) con un batuffolo di cotone sgrassato e versare nella colonna 2 g di gel di silice disattivato, in modo che la riempia fino ad una altezza di circa 20 cm (l'altezza è importante per la riproducibilità della separazione). Aggiungere un altro batuffolo di cotone sgrassato e uno strato di circa 1 cm di altezza di solfato di sodio anidro. Per il controllo dell'efficacia della colonna, senza prelavare il gel di silice aggiungere 1 mL di soluzione di riferimento cumulativa (6.19.5). Ciascun principio attivo dovrebbe essere ad una concentrazione di circa 0,1 µg/mL. Dopo adsorbimento, aggiungere 1 mL di esano (questa quantità serve per simulare il lavaggio del contenitore del campione). Dopo adsorbimento del solvente connettere il serbatoio alla colonna e quindi eluire, nell'ordine, con le seguenti miscele, cambiando il recipiente di raccolta quando il livello di un eluente raggiunge lo strato superiore del gel di silice:

a) n-esano: 26 mL. Questa frazione non contiene pesticidi organofosforici, quindi può essere scartata (contiene i PCB ed alcuni pesticidi clorurati);
b) benzene/esano (60:40): 15 mL. Questa frazione deve contenere bromofos, clorpirifos-metile, clorpirifos, fenitrotion;
c) benzene: 14 mL. Questa frazione deve contenere fenitrotion, etion, paration, paration-metile, pirimifos-metile;
d) etile acetato/benzene (1:1): 36 mL. Questa frazione deve contenere pirimifos-metile, paraoxon, paraoxon-metile, azinfos-etile, malation, malaoxon, diazinone, azinfos-metile, tetraclorvinfos, dimetoato.

Il flusso degli eluenti deve essere di circa 1-2 mL/min e può essere ottenuto applicando una lieve pressione in testa alla colonna. Raccogliere separatamente le frazioni b, c e d, concentrandole con l'evaporatore rotante e sotto leggero vuoto a piccolo volume ed effettuando per le frazioni b e c il cambio di solvente ad acetato d'etile. Portare a volume noto (1-5 mL) con acetato di etile ed analizzare in gascromatografia con rivelatore FPD.

C) Cromatografia del campione

Prima di procedere alla cromatografia, nel caso di campioni molto contaminati, l'estratto va

opportunamente diluito e la cromatografia su colonna effettuata su un'aliquota dello stesso. Usando la stessa tecnica utilizzata per la taratura dell'adsorbente e nelle condizioni di disattivazione prima identificate, introdurre la soluzione del campione concentrato ad 1 mL nella microcolonna e far adsorbire. Quindi, con 1 mL di esano lavare il contenitore del campione e introdurlo nella microcolonna. Eluire con i volumi più opportuni degli eluenti determinati nelle prove di taratura dell'adsorbente. Raccogliere separatamente le frazioni e procedere come descritto al punto 7.3.3.B. Eseguire l'analisi gascromatografica delle frazioni per la determinazione dei pesticidi.
Questa procedura di purificazione e frazionamento è utile nel caso di presenza nel campione di una miscela estremamente complessa di composti (pesticidi organoclorurati, PCB, pesticidi organofosforici, triazine). Utilizzare questa purificazione in genere quando l'analisi necessita di prove di conferma GC/MS o in GC/NPD.

7.4 Determinazioni gascromatografiche

Si consiglia di utilizzare come principale sistema di determinazione gascromatografica una colonna capillare a fase non polare (5% fenilsilicone + 95% metilsilicone, tipo SPB-5, DB-5 ecc.) ed un rivelatore FPD con filtro per il fosforo. Con tale colonna possono essere utilizzate le seguenti condizioni operative:

- Temperatura: iniettore 220°C, rivelatore (FPD-P) 250°C;
- colonna (30 m x 0,53 mm d.i.; spessore di fase 0,5 µm);
- programma di temperatura: 140°C per 2 min, quindi fino a 240°C a 5°C/min e 240°C per 2 min;
- gas di trasporto: azoto, 15 mL/min;
- gas ausiliario (make-up): azoto, 15 mL/min;
- Volume iniettato 1-3 µL.

Le condizioni gascromatografiche adottate sono accettabili quando 1 ng di metil-paration fornisce una risposta almeno pari al 40% dell'intera scala, con un rumore di fondo non superiore al 2%. I limiti di sensibilità strumentale (espressi in ng iniettati) e i gascromatogrammi di soluzioni di riferimento ottenute nelle condizioni indicate sono riportati, rispettivamente, in Tab. 3 ed in Fig. 3.

Tabella 3: Limiti di quantificazione degli insetticidi organofosforici, determinati con una colonna SPB-5 con rivelatore FPD-P (Segnale/rumore = 3; paration-metile (1 ng) = 40% f.s.d.)

Composti	ng	Composti	ng
Azinfos-etile	0,21	Fenitrotion	0,18
Azinfos-metile	0,45	Fosalone	0,31
Bromofos	0.12	Malaoxon	0,29
Clorfenvinfos E	0,23	Malation	0,18
Clorfenvinfos Z	0,18	Metidation	0,17
Clorpirifos	0,13	Monocrotofos	0,55
Clorpirifos-metile	0,10	Ometoato	0,10
Demeton-O	0,07	Paraoxon	0,15
Demeton-S-metile	0,09	Paraoxon-metile	0,21
Demeton-S-metilsolfone	1,18	Paration	0,26
Diazinone	0,13	Paration-metile	0,12
Dimetoato	0,21	Pirimifos-metile	0,11
Eptenofos	0,09	Tetraclorvinfos	0,20
Etion	0,14	Vamidotion	1,31

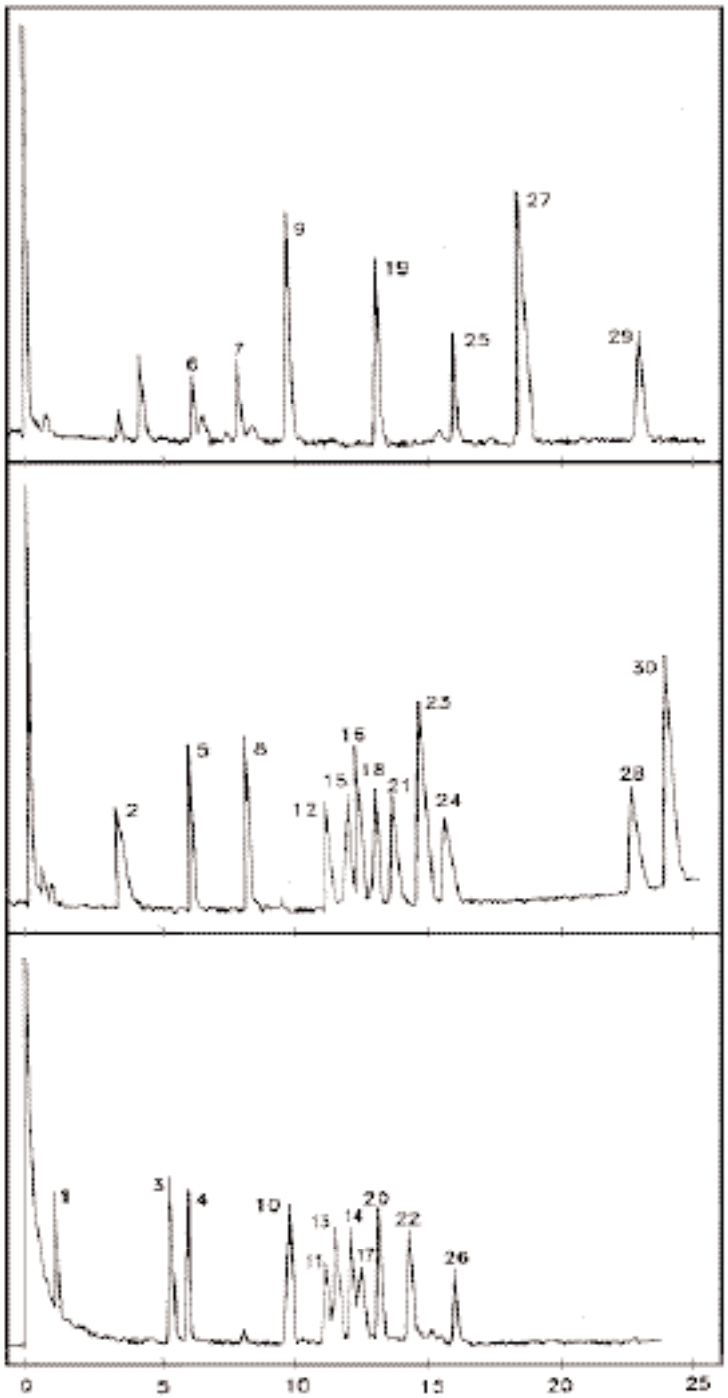


Figura 3: Gascromatogrammi di tre soluzioni di riferimento di insetticidi organofosforici, ottenuti nelle seguenti condizioni gascromatografiche: colonna SPB-5, temperatura 140°C per 2 min, aumenta a 240°C a 5°C/min e mantieni per 2 min; rivelatore FPD-P; velocità carta registratore 1 cm/min.
1) metamidofos, 2) acefate, 3) eptenofos, 4) demeton-O, 5) demeton-S-metile, 6) ometoato, 7) monocrotofos, 8) dimetoato, 9) diazinone, 10) paraoxon-metile, 11) clorpirifos-metile, 12) paration-metile, 13) malaoxon, 14) demeton-S-metilsolfone, 15) paraoxon, 16) fenitrotion, 17) pirimifos-metile, 18) malation, 19) clorpirifos, 20) paration, 21) bromofos, 22) clorfenvinfos E, 23) clorfenvinfos Z, 24) metidation, 25) tetraclorfenvinfos, 26) vamidotion, 27) etion, 28) azinfos-metile, 29) fosalone, 30) azinfos-etile.

Altri dati relativi ai tempi di ritenzione dei pesticidi organofosforici su colonne con differenti fasi stazionarie sono disponibili in letteratura. Iniettare frequentemente le soluzioni di riferimento per controllare la stabilità delle condizioni operative.

Per l'analisi qualitativa confrontare i tempi di ritenzione dei picchi eventualmente presenti nel cromatogramma con quelli delle soluzioni di riferimento, iniettati prima e dopo il campione. Le miscele di iniezione di riferimento e campione devono essere nel medesimo solvente. Per la conferma qualitativa di un picco si può aggiungere metil-paration (od altro composto se il metil-paration è presente nel campione o se nel cromatogramma sono presenti picchi ad un tempo di ritenzione relativo al metil-paration compreso nell'intervallo 0,9-1,1), iniettare di nuovo e confermare i tempi di ritenzione relativi.

Per l'analisi quantitativa iniettare 1 µL di solvente per verificare che non vi siano picchi dovuti a residui dalle precedenti iniezioni. Iniettare le soluzioni di riferimento relativi ai composti identificati nel campione. La concentrazione del composto nella soluzione di riferimento deve essere dello stesso ordine di grandezza di quella del composto nel campione. Iniettare quindi il campione e confrontare l'area relativa al singolo composto nel campione con quella relativa allo stesso composto nel cromatogramma della soluzione di riferimento.

7.5 Analisi di conferma

7.5.1 Impiego del rivelatore NPD

Il confronto della risposta del rivelatore NPD con quella ottenuta con FPD-P può essere utile nella conferma della identificazione di un composto (sulla base delle risposte relative) quando il composto stesso contiene nella sua molecola anche atomi di azoto. La sensibilità di questo rivelatore è inoltre circa 10 volte maggiore di quella dell'FPD. Il rivelatore NPD può essere seriamente danneggiato da solventi clorurati. Per eliminare qualsiasi traccia di diclorometano nell'estratto del campione da analizzare riprendere l'estratto, portato a piccolo volume con circa 2 mL di acetato di etile, e portare a 200-500 µL in corrente di azoto. Portare a volume noto (1-5 mL) con acetato di etile ed iniettare.

7.5.2 Frazionamento per cromatografia su microcolonna di gel di silice

Il frazionamento dei pesticidi organofosforici in tre gruppi può essere utile come tecnica di conferma. Inoltre l'eliminazione dalla miscela da analizzare di composti clorurati (PCB, pesticidi clorurati) e di erbicidi triazinici può essere utile nel caso di determinazione in GC/NPD ed in alcuni casi in GC/MS.

7.5.3 Impiego del rivelatore di massa

Costituisce un utilissimo mezzo di identificazione in quanto la sua risposta è in relazione al peso molecolare e alla struttura del composto. Può essere necessario far precedere un'accurata purificazione e un frazionamento su gel di silice per eliminare dalla miscela idrocarburi ed altri composti che possono portare alla saturazione del rivelatore nella parte iniziale del cromatogramma, impedendo l'analisi dei composti di interesse con tempi di ritenzione brevi.

8. Calcoli

Il calcolo della concentrazione di un generico pesticida organofosforico "i" nel campione di acqua in esame si effettua applicando la seguente formula:

$$C_i = \frac{S \cdot A_c \cdot V_f}{A_i \cdot V_i \cdot V_c}$$

dove:
C_i = concentrazione (µg/L) del composto "i" identificato nel campione;
S = quantità (ng) di riferimento iniettato;
A_c = area del picco relativo al composto "i" nel campione*;

V_f = volume finale (µL) dell'estratto;
A_s = area del picco relativo al composto "i" nel riferimento*;
V_i = volume (µL) di estratto iniettato;
V_c = volume (mL) di campione sottoposto all'analisi.

* le aree sono espresse in unità di misura convenzionali fornite dall'integratore.

9. Qualità del dato

Le prove di recupero, effettuate addizionando a 500 mL di acqua distillata 1 mL delle soluzioni di riferimento, hanno fornito i seguenti risultati (Tab. 4).

Tabella 4: Prove di recupero in acqua distillata (*estrazione non efficiente)

Composto	Concentrazione (µg/L)	Recupero (%)	Concentrazione (µg/L)	Recupero (%)
Acefate	37,8	*	3,0	*
Azinfos etile	42,2	90,1	1,7	99,3
Azinfos metile	61,0	97,6	4,9	112,0
Bromofos	43,2	88,2	3,5	83,1
Clorfenvinfos E	73,6	96,4	5,9	87,3
Clorfenvinfos Z	60,2	88,7	4,8	83,3
Clorpirifos	58,3	90,0	4,6	91,4
Clorpirifos-metile	62,8	92,3	5,0	86,7
Demeton-O	44,2	72,2	3,5	78,8
Demeton-S-metile	70,0	84,9	5,6	68,8
Demeton-S-metilsolfone	58,0	94,8	4,6	72,1
Diazinone	63,0	90,7	3,8	88,6
Dimetoato	47,6	88,8	3,8	82,6
Eptenofos	64,6	81,4	5,2	77,5
Etion	91,6	70,5	5,5	93,2
Fenitrotion	84,2	88,9	6,7	90,0
Fosalone	64,4	71,2	2,9	99,1
Malaoxon	94,8	97,3	7,6	75,9
Malation	98,0	87,8	8,6	87,4
Metamidofos	58,6	*	4,7	*
Metidation	55,8	89,6	4,5	80,4
Monocrotofos	55,4	*	3,4	*
Paraoxon	77,2	89,7	6,1	90,8
Paraoxon-metile	126,2	92,8	10,0	79,6
Paration	50,8	95,7	4,0	94,0
Paration metile	51,6	88,5	4,1	81,8
Pirimifos-metile	42,2	96,4	3,4	85,4
Tetraclorvinfos	53,0	76,2	3,2	97,2
Vamidotion	65,0	94,6	6,0	102,8
Valori medi	**63,9**	**88,3**	**4,8**	**87,3**

I recuperi delle prove a concentrazione più elevata risultano compresi nell'intervallo 71-97%, con un recupero medio dell'88%; i recuperi delle prove a concentrazione più bassa risultano compresi nell'intervallo 72-112% con un recupero medio dell'88%.
La tecnica di estrazione descritta non è efficace per l'acefate, il metamidofos e il monocrotofos (recupero percentuale 5-30%), a causa della loro elevata solubilità in acqua che è 650 g/L, 2000 g/L e 1000 g/L rispettivamente. Per l'estrazione di composti così altamente solu-

bili in acqua è necessario adottare condizioni più favorevoli per l'estrazione con solventi organici: saturazione della fase acquosa con cloruro di sodio, utilizzo di miscele organiche estraenti a polarità più elevata, come ad esempio un azeotropo cloroformio/acetone 4/1 (p/p) (Metodo 1657, EPA) e rapporto volume fase organica/volume fase acquosa più elevato. In alternativa, per controllo di acque di scarico di processi industriali relativi a tali principi attivi, si può iniettare direttamente il campione acquoso (eventualmente diluito 1:1 con acetone). Più opportunamente si può fare riferimento al metodo descritto in letteratura da Gerhart e Cortes, ove viene trattato esaurientemente il metodo di iniezione di campioni acquosi.
Prove di recupero effettuate su acque di scarico hanno sostanzialmente confermato i risultati ottenuti dalle prove di recupero da acqua distillata. I risultati relativi ad una prova di recupero sono riportati, a titolo di esempio in Tab. 5 ed in Fig. 4. Il gascromatogramma dell'estratto dell'acqua di scarico (Fig. 4, B), presenta un picco (c) identificato (tramite GC-MS, dopo puri-

Tabella 5: Prove di recupero in acqua di scarico (* estrazione non efficiente)

Composto	Concentrazione (µg/L)	Recupero %
Acefate	3,0	*
Azinfos etile	1,7	83,7
Azinfos metile	4,9	92,4
Bromofos	3,5	69,2
Clorfenvinfos Z	4,8	75,4
Demeton-S-metile	5,6	84,1
Dimetoato	3,8	88,7
Fenitrotion	6,7	93,7
Malation	8,6	78,3
Metidation	4,5	80,9
Paraoxon	6,1	82,4
Paration metile	4,1	81,8
Valori medi	**5,2**	**82,8**

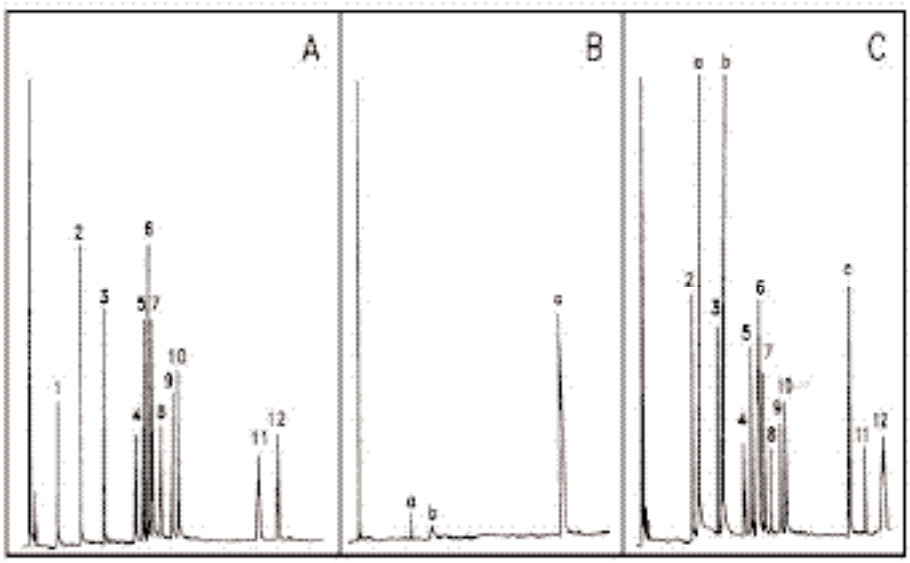


Figura 4: Gascromatogrammi di (A) soluzione di riferimento di insetticidi organofosforici, (B) estratto di acqua di scarico, (C) recupero da acqua di scarico addizionata di composti organofosforici.
Condizioni gascromatografiche: colonna SPB-5, temperatura 140°C per 2 min, aumenta a 240°C a 5°C/min e mantieni per 2 min; rivelatore FPD-P; velocità carta stampante 0,5 cm/min.
1) acefate, 2) demeton-O, 3) dimetoato, 4) paration-metile, 5) paraoxon, 6) fenitrotion, 7) malation, 8) bromofos, 9) clorfenvinfos Z, 10) metidation, 11) azinfos-metile, 12) azinfos-etile, a) tributil-fosfato, b) tris(2-cloroetil)fosfato, c) tris(2-butossietil) fosfato.

ficazione e frazionamento dell'estratto su gel di silice) come il tris(2-butossietil)fosfato. Altri picchi (a e b) sono dovuti alla presenza in tracce di tributilfosfato e tris(2-cloro-etil)fosfato rispettivamente. Allo scopo di verificare il loro comportamento all'estrazione, questi due fosfati organici, spesso presenti nelle acque di scarico a causa del loro ampio uso come additivi industriali, sono stati addizionati al campione insieme alla miscela di insetticidi organofosforici.

Nota: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".*
Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

BIBLIOGRAFIA

ALBANIS T.A., POMONIS P.J. & SDOUKOS A.Th. (1986): "Organophosphorus and carbamates pesticide residues in the aquatic system of Ioannina basin and Kalamas river", *Chemosphere,* **15**, 1023.

ALESSANDRINI M.E., LEONI V., DI SIMONE L., IMBROGLINI G. & ANGELELLI L. (1968): "Andamento dei residui di malathion nei grani trattati in scala semi-industriale e nei relativi prodotti di molitura", *Rassegna Chimica*, **5**, 201.

ANG C., MELEADY K. & WALLACE L. (1989): "Pesticide residues in drinking water in the North Coast Region of New South Wales, Australia", 1986-87", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **42**, 595.

APHA, AWWA, WEF (1981): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*" - Supplement to the XV Edition *"Selected analytical methods approved and cited by the United States Environmental Protection Agency - Method for Organophosphorous Pesticides in Water and Wastewater"*, SS 1-557.

BAGNATI R., BENFENATI E., DAVOLI E. & FANELLI R. (1988): "Screening of 21 pesticides in water by single extraction with C_{18} silica bonded phase columns and HRGC-MS", *Chemosphere,* **17**, 59.

BARCELÒ D., PORTE C., CID J. & ALBAIGÉS J. (1990): "Determination of organophosphorus compounds in mediterraneal waters and biota samples using gas chromatography with nitrogen-phosphorus and chemical ionization mass spectrometric detection", *Intern. J. Environ. Anal. Chem.,* **38**, 199.

BARDAROV V. & MITEWA M. (1989): "High-performance liquid and gas chromatography of dialkylphosphates, dialkylthioposphates and dialkyldithiophosphates as their pentafluorobenzyl derivatives", *J. Chromatogr.*, **462**, 233.

BRITISH CROP PROTECTION COUNCIL (1991): "The *Pesticide Manual",* IX edition, C.R. Worthing, Great Britain.

BROOKS M.W., TESSIER D., SODERSTROM D. JENKINS J. & MARSHALL CLARK J. (1990): "A rapid method for the simultaneous analysis of Chlorpyrifos, Isophenos, Carbaryl, Iprodione, and Triadimefon in groundwater by solid-phase extraction", *J. Chromatogr. Sci.*, **28**, 487.

CARRASCO J.M., PIANTA M., GOMEZ-CASALS W. & MORAGUES W. (1987): "Pesticide residues in Lake Albufera, Valencia, Spain", J. *Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**, 752.

CUNNIGHAM L.W. (1957): "Proposed Mechanism of action of hydrolitic enzymes", *Science,* **125**, 1145.

DI CORCIA A. & MARCHETTI M. (1991): "Multiresidue method for pesticides in drinking water using a graphitized Carbon Black cartridge extraction and liquid chromatographic analysis", *Anal. Chem.*, **63**, 580.

Decreto Legislativo 152/99, Disposizioni sulla tutela delle acque dall'inquinamento e recepimento della direttiva 91/271/CEE concernente il trattamento delle acque reflue urbane e della direttiva 91/676/CEE relativa alla protezione delle acque dall'inquinamento provocato dai nitrati provenienti da fonti agricole, *G.U. n. 124, 29 maggio 1999, Supplemento Ordinario n. 101/L.*

ETO M. (1974): in *"Organophosphorous pesticides: organic and biological chemistry", G.* Zweigg editor, CRC Press Inc., Washington D.C., 123-192.

FARRAN A., DE PABLO J. & BARCELÒ D. (1988): "Identification of organophosphorus insecticides and their hydrolysis products by liquid chromatography in combination with UV and thermospray-mass spectrometric detection", *J. Chromatogr.*, **455**, 163.

FOLLWEILER J.M. & SHERMA J. (1984): in "*CRC Handbook of Chromatography: Pesticides and Related Organic Chemicals*", G. Zweig and J. Sherma Editors, CRC Press, Inc., Boca Raton – Florida, Vol. I, pp. 67-85.

GERHART B.B. & CORTES H.J. (1990): "Determination of chlorpyrifos in water by large-volume direct aqueous injection capillary gas chromatography", *J. Chromatogr.*, **503**, 377.

GREVE P.A. & GOEWIE C.E. (1985): "Developments in the determination of organophosphorus pesticides", *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, **20**, 29.

HEATH D.F. (1961): in "*Organophosphorous Poisons: Anticholinesterases and related compounds*", International Series of Monographs on Pure and Applied Biology: Modern trends in physiological sciences. Pergamon Press, Oxford-London-New York-Paris, pp. 116-255.

KRUPKA R.M. (1966): "Chemical structure and function of the active center of acetylcholinesterase", *Biochemistry*, **5**, 1988.

LAW L.M. & GEORLITZ D.F. (1970): "Microcolumn chromatographic cleanup for the analysis of polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **53**, 1276.

LAWRENCE J., TOSINE H.M. & HELLE M. (1977): "Polychlorinated biphenyl concentrations in sewage and sludges of some waste treatment plants in southern Ontario", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **17**, 49.

LEES A. & MACVEIGH K. (1988): "*An investigation of pesticide pollution in drinking water in England and Wales*", Report pp. 151.

LEONI V., CREMISINI C., CASUCCIO A. & GULLOTTI A. (1991): "The separation of pesticides and related compounds, polychlorobiphenyls and other pollutants into four groups by silica gel microcolumn chromatography (Application to surface water analysis)", *Pest. Sci.*, **31**, 209-220.

LEONI V., CARICCHIA A.M. & CHIAVARINI S. (1992): "Multiresidue method for quantitation of organophosphorus pesticides in vegetable and animal foods", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **75**, 511.

LEONI V. & PUCCETTI G. (1971): "Cromatografia su strato sottile di pesticidi organofosforici in rapporto a studi di contaminazione ambientale (acque superficiali italiane)", *Il Farmaco*, **26**, 383.

LEONI V. & PUCCETTI G. (1978): "Stato di inquinamento da pesticidi del fiume Tevere e del suo bacino imbrifero", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **27**, 328.

LEONI V., PUCCETTI G., COLOMBO J. & D'OVIDIO A.M. (1976): "The use of Tenax for the extraction of pesticides and polychlorinated biphenyls from water. II. Tests with artificially polluted and natural waters", *J. Chromatogr.*, **125**, 399.

LOCONTO P.R. & GAIND A.K. (1989): "Isolation and recovery of organophosphorus pesticides from water by solid-phase extraction with dual wide-bore capillary gas chromatography", *J. Chromatogr. Sci.*, **27**, 569.

MALLET C. & MALLET V.N. (1989): "Conversion of a conventional packed-column gas cbromatograph to accomodate megabore columns. II. Determination of organophosphorus pesticides in environmental water", *J. Chromatogr.*, **481**, 37.

MANES VINUESA J., MOLTO CORTES J.C., IGUALDA CANAS C. & FONT PEREZ G. (1989): "Isolation and concentration of organophosphorus pesticides from water using a C_{18} reversed phase", *J. Chromatogr.*, **472**, 365.

MATTERN G.C., LOUIS J.B. & ROSEN J.D. (1991): "Multipesticide determination in surface, water by gas chromatography/chemical ionization/mass spectrometry/ion trap detection", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **74**, 982.

MELNIKOV N.N. (1971): "Chemistry of pesticides. Organophosphorus compounds", *Residue Reviews*, 36, 303-386.

Ministero della Sanità, Consiglio Sanitario Nazionale (1992): "*Relazione su stato sanitario del Paese, 1989*", vol. I, 230. Ed. Istituto Poligrafico dello Stato, Roma.

MOLTÒ J.C., PICÒ Y., FONT G. & MANES J. (1991): "Determination of triazines and organophosphorus pesticides in water samples using solid-phase extraction", *J. Chromatogr.*, **555**, 137.

NEICHEVA A., KOVACHEVA E. & MARUDOV G. (1988): "Determination of organophosphorus pesticides in apples and water by gas-liquid chromatography with electron-capture detection", *J. Chromatogr.*, **437**, 249.

O'BRIEN R.D. (1969): "Binding sites of cholinesterases", *Biochem. J.*, **113**, 713.

PREMAZZI G. (1983): "*Evaluation of the impact of malathion on the aquatic environment*", EEC, Joint Research Center, Ispra, I, 1-67.

PRINSLOO S.M. & DE BEER P.R. (1987): "Gas chromatographic relative retention data for pesticides on fine packed columns: II. organophosphorus and organochlorine pesticides, using electron-capture detection", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **70**, 878.

REDING R. (1987): "Chromatographic monitoring methods for organic contaminants under the Safe Drinking Water Act", *J. Chromatogr. Sci.*, **25**, 338.

ROWLANDS D.G. & HORLER D.F. (1967): "Malathion residues in wheat", *Proc. of IV Brit. Insecticides and Fungicides Conference*, Vol. I, 331.

STOUT S.J., DA CUNHA A., BOYD J.E. & DEVINE J.M. (1989): "Confirmation of phorate, terbufos and their sulfoxides sud sulfones in water by capillary gas chromatography/chemical ionization mass spectrometry", *J. Assoc. 0ff. Anal. Chem.*, **72**, 987.

THOMPSON J.F., MANN J.B., APODACA A.O. & KANTOR E.J. (1975): "Relative retention ratios of 95 pesticides and metabolites on nine gas-liquid cbromatograpbic columns over a temperature range of 170 to 204°C in two detection modes", *J. Assoc. 0ff. Anal. Chem.*, **58**, 1037.

TSUDA T., AOKI S., KOJIMA M. & FUJITA T. (1992): "Pesticides in water and fish from rivers flowing into Lake Biwa", *Chemosphere*, **24**, 1523.

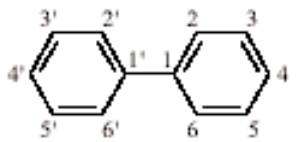
U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1986): Method 507, "*Determination of Nitrogen- and Phosphorous-Containing Pesticides in Groundwater by Gas Chromatographv with a Nitrogen-Phosphorous Detector*", Environmental Monitoring and Support Laboratory, Cincinnati, OH 45268.

U.N.E.P. (1991): "*Assessment of the state of pollution of the Mediterranean Sea by Organophosphorous compounds*", MAP Technical Reports Series No. 58, pp. 122.

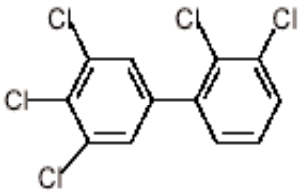
WILKINS J.P.G., HILL A.R.C. & LEE D.F. (1985): "Organophosphorus sulphides, sulphoxides and sulphones. Part 2. Characterisation by gas cbromatography-mass spectrometry", *Analyst*, **110**, 1045.

5110. Policlorobifenili e policloroterfenili

I policlorobifenili (PCB) costituiscono una classe di 209 composti, aventi da 1 a 10 atomi di cloro come sostituenti nella molecola del bifenile. La struttura generale dei PCB, la suddivisione per classi isomeriche (congeneri con eguale numero di atomi di cloro in molecola), la composizione delle più comuni miscele commerciali e l'elenco dei 209 congeneri con la numerazione sistematica stabilita da Ballschmiter e Zell sono riportati in Fig. 1 e nelle Tabb. 1A, 1B e 2.
I PCB possiedono proprietà tali (ininfiammabilità, bassissima volatilità a temperatura ambiente, ecc.) da renderli adatti a numerosi impieghi industriali (dielettrici per trasformatori e condensatori, fluidi per il trasporto del calore, inchiostri da stampa e carte copiatrici "senza carbone", vernici, plastificanti, oli da taglio, ecc.). Quasi tutti questi impieghi sono oggi cessati, in rapporto al progredire delle conoscenze sulla pericolosità ambientale dei PCB e sulla loro tossicità per l'uomo. D'altra parte se si considera che un trasformatore industriale ha una vita media di 15-20 anni e può contenere alcuni quintali di PCB, ben si comprende la necessità di controllare, anche in futuro, ogni possibile sorgente di contaminazione. Quindi per le loro caratteristiche di elevata persistenza ambientale e tossicità i PCB sono stati classificati tra i prodotti pericolosi da regolamentare in maniera prioritaria. Inoltre sono stati identificati e dosati, in Italia ed altrove, nelle acque dolci superficiali, nelle acque marine e nei sedimenti e, poichè si bioconcentrano ai vari livelli della catena alimentare, soprattutto in matrici biologiche.
I PCB, con diverse denominazioni, sono stati prodotti da vari paesi industrializzati: Aroclor (USA), Fenclor (Italia), Clophen (Germania), Phenoclor (Francia), ecc. Opportune sigle numeriche, che fanno riferimento soprattutto alla percentuale in cloro dei prodotti commerciali, consentono di differenziare tra loro i vari prodotti di una stessa serie (esempio Aroclor 1260, contenuto percentuale di cloro 60%; il 12 si riferisce al numero di atomi di carbonio nella molecola del bifenile). Le Tabb. 3A e 3B riassumono le principali caratteristiche di alcune miscele commerciali di PCB. Ai fini del metodo occorre rilevare che oggi tutti gli isomeri sono disponibili in commercio al grado di purezza di standard analitico così come le principali miscele commerciali.
I PCB, una volta immessi nell'ambiente, possono andare incontro a destini diversi: gli isomeri con maggior numero di atomi di cloro sono generalmente i più stabili, mentre quelli a più basso livello di clorurazione sono soggetti ad una lenta degradazione, in particolare ad opera di microrganismi. Ne consegue che ogni campione ambientale può presentare una particolare distribuzione dei diversi isomeri e, generalmente, non si ha corrispondenza tra miscele commerciali di PCB e campione analizzato. Nelle acque di scarico tale corrispondenza è più probabile poiché la contaminazione, se presente, è presumibilmente dovuta a diretta immissione di residui che hanno subito scarsa o nessuna modificazione degradativa.
I policloroterfenili (PCT) presentano caratteristiche chimiche e fisiche analoghe a quelle dei po-



numerazione sugli anelli dei bifenili



esempio: struttura del 2, 3, 3', 4', 5' pentaclorobifenile

Figura 1: Struttura del 2, 3, 3', 4', 5' - pentaclorobifenile.

Tabella 1A - Classi isomeriche dei PCB

classe isomerica	formula	peso molecolare	% cloro	numero isomeri
mono-CB	$C_{12}H_9Cl$	188	18	3
di-CB	$C_{12}H_8Cl_2$	222	31	12
tri-CB	$C_{12}H_7Cl_3$	256	41	24
tetra-CB	$C_{12}H_6Cl_4$	290	48	42
penta-CB	$C_{12}H_5Cl_5$	324	54	46
esa-CB	$C_{12}H_4Cl_6$	358	58	42
epta-CB	$C_{12}H_3Cl_7$	392	62	24
otta-CB	$C_{12}H_2Cl_8$	426	65	12
nona-CB	$C_{12}H_1Cl_9$	460	68	3
deca-CB (DCB)	$C_{12}Cl_{10}$	494	79	1

Tabella1B: Quantità percentuale delle classi isomeriche dei PCB nelle quattro più comuni miscele commerciali (Aroclors)

classe isomerica	1242	1248	1254	1260
mono-CB	3	-	-	-
di-CB	13	2	-	-
tri-CB	28	18	-	-
tetra-CB	30	40	11	-
penta-CB	22	36	49	12
esa-CB	4	4	34	38
epta-CB	-	-	6	41
otta-CB	-	-	-	8
nona-CB	-	-	-	1
deca-CB (DCB)	-	-	-	-

Tabella 2: Nomenclatura sistematica dei PCB (da Ballschmiter)

No.	struttura	No.	struttura	No.	struttura	No.	struttura
	mono-CB						
1	2	52	2.2′.5.5′	105	2.3.3′.4.4′	161	2.3.3′.4.5′.6
2	3	53	2.2′.5.6′	106	2.3.3′.4.5	162	2.3.3′.4′.5.5′
3	4	54	2.2′.6.6′	107	2.3.3′.4′.5	163	2.3.3′.4′.5.6
		55	2.3.3′.4	108	2.3.3′.4.5′	164	2.3.3′.4′.5′.6
	di-CB	56	2.3.3′.4′	109	2.3.3′.4.6	165	2.3.3′.5.5′.6
4	2.2′	57	2.3.3′.5	110	2.3.3′.4′.6	166	2.3.4.4′.5.6
5	2.3	58	2.3.3′.5′	111	2.3.3′.5.5′	167	2.3′.4.4′.5.5′
6	2.3′	59	2.3.3′.6	112	2.3.3′.5.6	168	2.3′.4.4′.5′.6
7	2.4	60	2.3.4.4′	113	2.3.3′.5′.6	169	3.3′.4.4′.5.5′
8	2.4′	61	2.3.4.5	114	2.3.4.4′.5		
9	2.5	62	2.3.4.6	115	2.3.4.4′.6		**epta-CB**
10	2.6	63	2.3.4′.5	116	2.3.4.5.6	170	2.2′.3.3′.4.4′.5
11	3.3′	64	2.3.4′.6	117	2.3.4′.5.6	171	2.2′.3.3′.4.4′.6
12	3.4	65	2.3.5.6	118	2.3′.4.4′.5	172	2.2′.3.3′.4.5.5′
13	3.4′	66	2.3′.4.4′	119	2.3′.4.4′.6	173	2.2′.3.3′.4.5.6
14	3.5	67	2.3′.4.5	120	2.3′.4.5.5′	174	2.2′.3.3′.4.5.6′
15	4.4′	68	2.3′.4′.5	121	2.3′.4.5′.6	175	2.2′.3.3′.4.5′.6
	tri-CB	70	2.3′.4.5′	123	2′.3.4.4′.5	177	2.2′.3.3′.4′.5.6
16	2.2′.3	71	2.3′.4′.6	124	2′.3.4.5.5′	178	2.2′.3.3′.5.5′.6
17	2.2′.4	72	2.3′.5.5′	125	2′.3.4.5.6′	179	2.2′.3.3′.5.6.6′
18	2.2′.5	73	2.3′.5′.6	126	3.3′.4.4′.5	180	2.2′.3.4.4′.5.5′
19	2.2′.6	74	2.4.4′.5	127	3.3′.4.5.5′	181	2.2′.3.4.4′.5.6

segue

segue

No.	struttura	No.	struttura	No.	struttura	No.	struttura
20	2.3.3′	75	2.4.4′.6			182	2.2′.3.4.4′.5.6′
21	2.3.4	76	2′.3.4.5	**Esa-CB**		183	2.2′.3.4.4′.5′.6
22	2.3.4′	77	3.3′.4.4′	128	2.2′.3.3′.4.4′	184	2.2′.3.4.4′.6.6′
23	2.3.5	78	3.3′.4.5	129	2.2′.3.3′.4.5	185	2.2′.3.4.5.5′.6
24	2.3.6	79	3.3′.4.5′	130	2.2′.3.3′.4.5′	186	2.2′.3.4.5.6.6′
25	2.3′.4	80	3.3′.5.5′	131	2.2′.3.3′.4.6	187	2.2′.3.4′.5.5′.6
26	2.3′.5	81	3.4.4′.5	132	2.2′.3.3′.4.6′	188	2.2′.3.4′.5.6.6′
27	2.3′.6			133	2.2′.3.3′.5.5′	189	2.3.3′.4.4′.5.5′
28	2.4.4′		**penta-CB**	134	2.2′.3.3′.5.6	190	2.3.3′.4.4′.5.6
29	2.4.5	82	2.2′.3.3′.4	135	2.2′.3.3′.5.6′	191	2.3.3′.4.4′.5′.6
30	2.4.6	83	2.2′.3.3′.5	136	2.2′.3.3′.6.6′	192	2.3.3′.4.5.5′.6
31	2.4′.5	84	2.2′.3.3′.6	137	2.2′.3.4.4′.5	193	2.3.3′.4′.5.5′.6
32	2.4′.6	85	2.2′.3.4.4′	138	2.2′.3.4.4′.5′		
33	2′.3.4	86	2.2′.3.4.5	139	2.2′.3.4.4′.6		**otta-CB**
34	2′.3.5	87	2.2′.3.4.5′	140	2.2′.3.4.4′.6′	194	2.2′.3.3′.4.4′.5.5′
35	3.3′.4	88	2.2′.3.4.6	141	2.2′.3.4.5.5′	195	2.2′.3.3′.4.4′.5.6
36	3.3′5	89	2.2′.3.4.6′	142	2.2′.3.4.5.6	196	2.2′.3.3′.4.4′.5′.6
37	3.4.4′	90	2.2′.3.4′.5	143	2.2′.3.4.5.6′	197	2.2′.3.3′.4.4′.6.6′
38	3.4.5	91	2.2′.3.4′.6	144	2.2′.3.4.5′.6	198	2.2′.3.3′.4.5.5′.6
39	3.4′.5	92	2.2′.3.5.5′	145	2.2′.3.4.6.6′	199	2.2′.3.3′.4.5.6.6′
		93	2.2′.3.5.6	146	2.2′.3.4′.5.5′	200	2.2′.3.3′.4.5′.6.6′
	tetra-CB	94	2.2′.3.5.6′	147	2.2′.3.4′.5.6	201	2.2′.3.3′.4′.5.5′.6
40	2.2′.3.3′	95	2.2′.3.5′.6	148	2.2′.3.4′.5.6′	201	2.2′.3.3′.5.5′.6.6′
41	2.2′3.4	96	2.2′.3.6.6′	149	2.2′.3.4′.5′.6	203	2.2′.3.4.4′.5.5′.6
42	2.2′3.4′	97	2.2′.3′.4.5	150	2.2′.3.4′.6.6′	204	2.2′.3.4.4′.5.6.6′
43	2.2′.3.5	98	2.2′.3′.4.6	151	2.2′.3.5.5′.6	205	2.3.3′.4.4′.5.5′.6
44	2.2′.3.5′	99	2.2′.4.4′.5	152	2.2′.3.5.6.6′		
45	2.2′3.6	100	2.2′.4.4′.6	153	2.2′.4.4′.5.5′		**nona-CB**
46	2.2′.3.6′	101	2.2′.4.5.5′	154	2.2′.4.4′.5.6′	206	2.2′.3.3′.4.4′.5.5′6
47	2.2′.4.4′	102	2.2′.4.5.6′	155	2.2′.4.4′.6.6′	207	2.2′.3.3′.4.4′.5.6.6′
48	2.2′.4.5	103	2.2′.4.5′.6	156	2.3.3′.4.4′.5	208	2.2′.3.3′.4.5.5′.6.6′
49	2.2′.4.5′	104	2.2′.4.6.6′	157	2.3.3′.4.4′.5′		
50	2.2′.4.6			158	2.3.3′.4.4′.6		**deca-CB**
51	2.2′.4.6′			159	2.3.3′.4.5.5′	209	2.2′.3.3′.4.4′.5.5′.6.6′
				160	2.3.3′.4.5.6		

liclorobifenili. Essi erano presenti in prodotti commerciali, soprattutto negli USA, anche in miscela con i PCB. Sono conosciuti in Italia con il nome generico di Cloresil e negli USA con la stessa denominazione di Aroclor, già utilizzata per i PCB. In quest'ultimo caso sigle di riferimento opportune differenziano i PCB dai PCT, così gli Aroclor 5432, 5442 e 5460 sono miscele di policloroterfenili contenenti cloro in misura rispettivamente del 32%, 42% e 60% in peso; il 54 della sigla deriva da 18 (numero di atomi di carbonio del terfenile) moltiplicato 3 (numero di isomeri del terfenile: orto, meta e para).
Dal punto di vista normativo i PCB e i PCT sono stati assimilati ai pesticidi clorurati, nonostante la diversa utilizzazione e la diversa tossicità ed i limiti di concentrazione nelle acque di scarico (0,05 mg/L, Tab. 3, All. 5 del D.Lgs.152/99) vengono riferiti al totale di pesticidi clorurati + PCB + PCT.
Questo metodo permette la determinazione di PCB e PCT nelle acque di scarico. La determinazione dei PCT è inserita nel metodo allo scopo di adeguare il metodo stesso alla normativa vigente; d'altra parte, considerando il limitatissimo impiego che hanno avuto questi composti in Italia e la scarsità di dati sulla loro presenza nelle acque ed in altre matrici (con conseguente difficoltà di valutare l'affidabilità delle procedure analitiche), la loro presenza nei campioni da analizzare appare assai poco probabile.

Molte fasi della procedura per la determinazione dei PCB e PCT sono le stesse di quella per la determinazione dei pesticidi clorurati (Sezione 5090 "Pesticidi clorurati"), in quanto questi composti sono strettamente correlati dal punto di vista chimico. Si consiglia pertanto di leggere attentamente quel metodo, al quale spesso si fa riferimento e si rimanda.
La procedura analitica seguita e le modalità di espressione dei risultati rivestono un'importanza fondamentale nella determinazione dei PCB.
Il risultato finale può essere espresso infatti in µg/L di una o più miscele commerciali (ad esempio Aroclors) ed in questo caso è necessario individuare nel campione una distribuzione dei singoli congeneri simile od eguale a quella della/delle miscele commerciali.
Utilizzando un rivelatore di massa operante in SIM (Selected Ion Monitoring), si possono invece dosare le diverse classi isomeriche o buona parte dei singoli isomeri ed esprimere il risultato come µg/L di "PCB totali". Entrambi questi metodi di calcolo quantitativo permettono una valutazione adeguata del campione in base alla normativa italiana che non fornisce nessuna indicazione in merito e parla solo genericamente di "PCB totali".
Si può infine esprimere il risultato in "equivalenti di decaclorobifenile (DCB)" quando per la determinazione si adotta il metodo della perclorazione che trasforma tutti i PCB in DCB; quest'ultima procedura non fornisce nessuna informazione sui singoli PCB, né sulla miscela commerciale (una o più) responsabile della contaminazione.

1. Principio del metodo

Il metodo consiste in estrazione liquido-liquido con miscela n-esano/diclorometano, purificazione preliminare per ripartizione con acetonitrile, eliminazione dello zolfo e purificazione/frazionamento per cromatografia su gel di silice. L'analisi finale è eseguita mediante gascromatografia/spettrometria di massa (GC-MS) o gascromatografia/rivelatore a cattura di elettroni (GC-ECD).

Tabella 3A: Caratteristiche chimico-fisiche di alcuni policlorobifenili (Fenclor)

Caratteristiche	Fenclor 42	Fenclor 54	Fenclor 64	Fenclor 70
Stato fisico a 20°C	liquido	olio viscoso	resina molle	resina dura
Costituenti principali	triclorobifenili	pentaclorobifenili	esaclorobifenili	epta-octa-clorobifenili
Contenuto medio in cloro (% in peso)	38-41	50-54	58-62	63-68
Densità a 20°C	1,37-1,39	1,52-1,39	1,63-1,64	1,67-1,68
Punto di combustione (°C)	335	nessuno	nessuno	nessuno
Perdita all'evaporazione (6 ore a 100 °C)	0,0-0,4%			
Viscosità Engler a 25°C a 98°C	 4-5 -	 - 1,3-1,4	 - 2,1-2,3	 - 3,3-3,6

Tabella 3B: Caratteristiche chimico-fisiche di alcuni policlorobifenili prodotti in USA (Aroclor)

Caratteristiche	Aroclor 1221	Aroclor 1016	Aroclor 1242	Aroclor 1254	Aroclor 1260
Stato fisico a T ambiente	olio	olio	olio	liquido viscoso	resina molle
Contenuto medio in cloro (% in peso)	20,5-21,5	41	42	54	60
Densità a 20°C	1,18-1,19	-	1,38-1,39	-	1,50
Temperatura di infiammabilità (°C; Cleveland open cup)	141-150	-	176-180	nessuna	nessuna
Velocità di vaporizzazione ($g/cm^2/h$ a 100°C)	0,00174	-	0,000338	0,000053	0,000009
Viscosità (37,8°C; sec. Saybolt Universal)	38-41	71-81	82-92	1800-2500	-

2. Campo di applicazione

Il metodo permette la determinazione dei PCB e PCT nelle acque di scarico a livelli di concentrazione abbondantemente inferiori a 0,1 µg/L per singolo composto.

3. Interferenze e cause di errore

La possibile contaminazione dei solventi, dei reagenti e della vetreria impiegati nell'analisi, l'eventuale contaminazione dello stesso ambiente di lavoro e, in generale, ogni trattamento del campione possono causare problemi e portare alla presenza di picchi interferenti nei cromatogrammi e/o alterazioni della corrente di fondo del rivelatore con conseguenti difficoltà di interpretazione e/o interpretazioni errate del tracciato gascromatografico. Tutti i materiali utilizzati devono essere, pertanto, esenti da interferenze nelle condizioni operative adottate. È quindi buona norma di laboratorio, all'inizio dell'indagine e periodicamente, sottoporre all'intera procedura uno o più "bianchi", sostituendo al campione acqua distillata, per la verifica di eventuali interferenze provenienti dai materiali. Nel caso di presenza di interferenze, occorre individuarne la provenienza, analizzando ogni singolo passaggio della procedura e procedere alla loro eliminazione. Può essere richiesta una specifica selezione dei reattivi ed una purificazione dei solventi per mezzo di distillazione.
Le sostanze di varia natura estratte insieme ai PCB dagli effluenti industriali sono in quantità non trascurabile e possono causare difficoltà nell'ottenere misure precise ed accurate, soprattutto quando si usa un rivelatore a cattura di elettroni.
Uno dei maggiori problemi nelle determinazioni gascromatografiche di inquinanti organici con rivelatore a cattura di elettroni è rappresentato dagli esteri ftalici. Essi vengono aggiunti in varie percentuali nei comuni materiali plastici flessibili dai quali sono facilmente estratti con conseguente produzione di picchi interferenti nel gascromatogramma. È quindi necessario evitare l'uso di materiali in plastica (controllare anche le guarnizioni dei tappi; debbono essere sempre in teflon). Questi composti hanno vastissima diffusione ambientale e possono inoltre provenire dallo stesso laboratorio ove vengono effettuate le analisi. Può essere inoltre necessaria una purificazione dei solventi per distillazione, di alcuni reagenti per trattamento in muffola e della vetreria per lavaggio con solventi, al fine di eliminare una contaminazione di fondo. Con la purificazione per cromatografia su gel di silice suggerita in questo metodo gli ftalati vengono eliminati dall'estratto e quindi non costituiscono interferenza nella successiva determinazione dei PCB. Gli ftalati infine non danno interferenza se si adotta la tecnica della perclorazione.
Altra sostanza che può causare seria interferenza è lo zolfo; la sua presenza in elevata concentrazione può portare alla saturazione del rivelatore a cattura di elettroni o, in bassa concentrazione, alla presenza di tre o più picchi che possono interferire nell'analisi del tracciato gascromatografico.
Altra interferenza da prendere in seria considerazione è quella dovuta ai pesticidi clorurati ed in particolare al p,p'-DDT ed ai suoi principali prodotti di degradazione. Tale interferenza può essere eliminata con la tecnica di Snyder e Reinert, modificata da Leoni. Anche in questo caso l'adozione della tecnica della perclorazione porta alla eliminazione dell'interferenza. Per ulteriori considerazioni si può fare riferimento all'analogo paragrafo della Sezione 5090 "Pesticidi clorurati".
Anche i polibromobifenili (PBB), in genere utilizzati come ritardanti di fiamma, potrebbero causare interferenza. Per questi composti esistono però scarse informazioni e pochissimi dati in letteratura. Il PBB più noto come ritardante di fiamma ha la sigla PB-6b ed è costituito prevalentemente dal 2,4,5,2',4',5' esabromobifenile. Possono tuttavia essere presenti altri composti (dal pentabromo all'eptabromobifenile) che contribuiscono a dare un gascromatogramma complesso e simile a quello dei PCB. Se nei campioni da analizzare si sospetta, in base al ciclo produttivo dell'azienda, la presenza di PBB è necessaria molta attenzione nell'identificazione dei picchi cromatografici ricorrendo, se disponibile in laboratorio, all'uso del rivelatore di massa (GC/MS).
Infine un'altra interferenza può essere rappresentata da alcuni esteri fosforici. Anche in que-

sto caso tuttavia, adottando la tecnica di purificazione su gel di silice disattivato si può eliminare l'interferenza, poiché questi composti non vengono eluiti nella stessa frazione dei PCB. Per gli esteri fosforici che presentano tempi di ritenzione vicini a quelli dei PCB sulle più comuni colonne gascromatografiche, si possono comunque effettuare controlli analitici mediante gascromatografia con rivelatore fotometrico per il fosforo (FPD) o con rivelatore a ionizzazione di metalli alcalini (NPD).

4. Campionamento e conservazione del campione

I campioni debbono essere prelevati in bottiglie di vetro neutro, possibilmente scuro, della capacità di 1 litro, con chiusura a smeriglio oppure a vite con guarnizione di teflon. Prima del riempimento, le bottiglie (precedentemente lavate in laboratorio con acqua distillata e quindi con esano ed acetone) devono essere risciacquate con la stessa acqua che si desidera campionare. Occorre evitare l'uso di qualsiasi dispositivo in plastica. È buona norma campionare almeno due aliquote per ciascun campione.
Se si sospetta che i campioni così prelevati non siano rappresentativi della composizione dell'effluente, il campionamento dovrà essere effettuato secondo i criteri e le modalità descritte nella Sezione 1030 "Metodi di campionamento".
I campioni possono essere conservati in frigorifero per una settimana; eventuali degradazioni microbiche possono essere bloccate dall'aggiunta di HCl concentrato (1 mL/L di campione).

5. Apparecchiature

5.1 *Gascromatografo* che consenta l'impiego di colonne capillari.

5.2 *Rivelatori*

Rivelatore di massa (MS) operante in SIM, che consente in alcuni casi 1'analisi quantitativa di congeneri non separabili cromatograficamente. Se tale rivelatore non è disponibile si può utilizzare il rivelatore ECD.

5.3 *Sistema di acquisizione ed elaborazione dei dati cromatografici*

5.4 *Evaporatore rotante,* con possibilità di operare con il vuoto e con bagno termostatico ed opportuno sistema per il recupero dei solventi.

5.5 *Vetreria*

Oltre la normale vetreria in uso nel laboratorio si indicano qui di seguito alcuni elementi indispensabili per l'analisi. Una lista più dettagliata è inclusa nella Sezione 5090.

5.5.1 Colonna in vetro per disidratazione su solfato di sodio anidro (lunghezza=10 cm, d.i.=3,5 cm), senza setto poroso, con gambo sfinato (d.i=10 mm). Il setto poroso è sostituito da un piccolo batuffolo di cotone sgrassato, opportunamente inserito nel punto di restringimento in fondo alla colonna. In alternativa si possono utilizzare le colonne per la disidratazione in accordo con le specifiche EPA (volume serbatoio=60 mL, lunghezza colonna 10 cm, d.i. 2 cm, gambo sfinato (d.i =8 mm) (vedi Fig. 2).

5.5.2 Colonna cromatografica in vetro (h=30 cm, d.i.=4,2 mm), con parte inferiore sfinata (h=3,5 cm, d.i.=2 mm) e serbatoio di riserva solventi della capacità di circa 60 mL (vedi Fig. 3).

5.5.3 Fiale o provette da concentrazione in vetro (preferibilmente con gambo sfinato graduato a 0,5 mL ed 1 mL) da 5 mL, 10 mL, 15 mL e 25 mL.

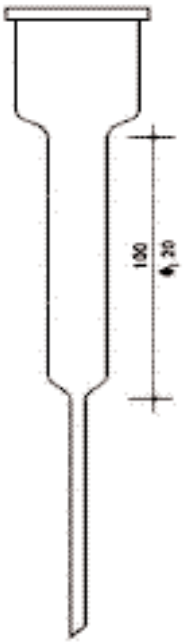


Figura 2: Colonna per disidratazione secondo le specifiche EPA (le misure sono espresse in mm).

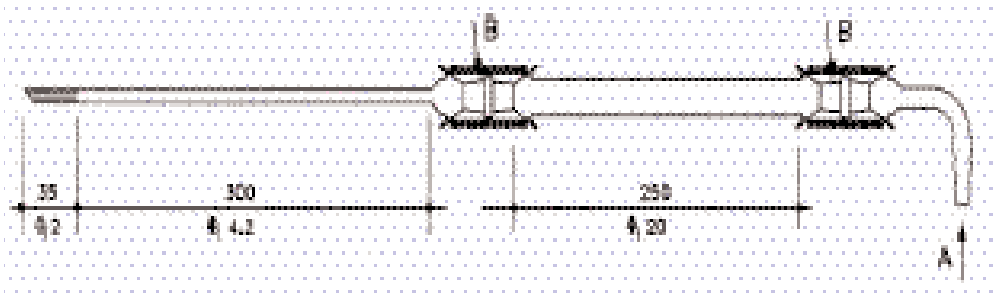


Figura 3: Microcolonna per la separazione di pesticidi ed altri composti in quattro gruppi. A, ingresso aria per ottenere una leggera pressione; B, giunto 10/19 (le misure sono espresse in mm).

5.5.4 Imbuti separatori da 125 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL, muniti di tappo a smeriglio e rubinetto in teflon.

5.5.5 Palloni (preferibilmente a cuore) con cono smeriglio adatto per l'evaporatore rotante, di cui al punto 5.4, aventi capacità di 50 mL, 100 mL e 250 mL.

5.5.6 Matracci tarati con tappo smeriglio da 10 mL, 50 mL, 100 mL e 1000 mL.

5.5.7 Pipette graduate di precisione (1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL).

5.6 Colonne gascromatografiche

Le colonne e le fasi stazionarie consigliate per l'analisi dei PCB sono descritte nello schema seguente. Si consiglia di utilizzare colonne con rapporto di fase (raggio/2 x spessore di fase) circa 250 e di lunghezza non inferiore a 30 m.

Fase stazionaria	Nomi commerciali fase/colonna
Non polare	
metil silicone	SE-30, DB-1, SPB-1 *o equivalenti*
5%fenilsilicone + 95%metilsilicone	SPB-5, PTE-5, SE-54, ULTRA-2 *o equivalenti*
Polare	
(non dichiarata)	SPB-608
cianopropilsilicone stabilizzato	SP-2331 o equivalenti

5.7 *Microsiringhe per gascromatografia* (tipo Hamilton o equivalenti) da 5 e 10 µL.

5.8 *Bilancia analitica,* risoluzione 0.1 mg.

6. Reattivi

6.1 *Solventi*

Tutti i solventi, a meno che non siano specificatamente dichiarati "per analisi di pesticidi" vanno sottoposti a purificazione mediante distillazione con apparecchiature "tutto vetro". È consigliabile che per ogni solvente si disponga di un'apposita apparecchiatura di distillazione. Tutti i solventi debbono essere comunque controllati prima di essere utilizzati, usando le quantità impiegate nella procedura, concentrando al volume finale indicato in procedura (generalmente 1 mL) ed analizzandoli in gascromatografia.

6.1.1 n-Esano "per analisi pesticidi"

6.1.2 Diclorometano "per analisi pesticidi"

6.1.3 Acetonitrile "per analisi pesticidi"

6.1.4 Benzene "per analisi pesticidi"

6.1.5 n-Pentano "per analisi pesticidi"

6.1.6 Acetone "per analisi pesticidi"

6.1.7 Toluene "per analisi pesticidi"

6.2 *Acqua distillata*

Esente da sostanze organiche che possano interferire nelle analisi (esempio: acqua distillata trattata su sistemi dotati di apposita cartuccia a carbone attivo). L'acqua distillata così ottenuta deve essere controllata con una prova di "bianco".

6.3 *Acido cloridrico concentrato*

6.4 *Solfato di sodio* granulare anidro trattato in muffola a 450°C per almeno 4 ore e conservato in recipiente di vetro (precedentemente lavato con acqua distillata, acetone ed esano ed asciugato) ermeticamente chiuso.

6.5 *Cloruro di sodio* trattato in muffola a 450°C per almeno 4 ore e conservato in recipiente di vetro (precedentemente lavato con acqua distillata, acetone ed esano ed asciugato) ermeticamente chiuso.

6.5.1 Soluzione satura di cloruro di sodio (6.5) in acqua distillata (6.2).

6.5.2 Soluzione al 2% (p/p) di cloruro di sodio (6.5) in acqua distillata (6.2).

6.6 *Cotone sgrassato* in Soxhlet con una miscela n-esano/acetone 1:1 (v/v) per 12 ore, lasciato asciugare e conservato in recipiente di vetro (precedentemente lavato con acqua distillata, acetone ed esano ed asciugato) ermeticamente chiuso.

6.7 *Gel di silice* (secondo specifiche ASTM D-1319-70, 100/200 mesh), trattato in muffola a 200°C per 8 ore e conservato in beuta con tappo a smeriglio (precedentemente lavata con acqua distillata, acetone ed esano e ben asciugata) posta in essiccatore in presenza di agenti essiccanti. Il gel così preparato conserva le sue caratteristiche per circa una settimana, ma è comunque preferibile prepararlo poco prima della analisi.

6.8 *Gel di silice* (ASTM 70/230 mesh), trattato in muffola a 200°C per 8 ore e conservato in beuta con tappo a smeriglio (pecedentemente lavata con acqua distillata, acetone ed esano e ben asciugata) posta in essiccatore in presenza di agenti essiccanti. Il gel così preparato conserva le sue caratteristiche per circa una settimana.

6.9 *Acido solforico concentrato*

6.9.1 Gel di silice/acido solforico concentrato 60:40 (p/p)

Mettere in una beuta una quantità esattamente pesata di gel di silice (6.8) ed aggiungere lentamente una quantità di acido solforico concentrato tale da avere un rapporto finale in peso: gel di silice/acido solforico 60:40. Tappare con cura la beuta ed agitare vigorosamente fino a completa scomparsa di grumi o disomogeneità evidenti. Tutte le operazioni vanno eseguite con la massima cautela, sotto cappa e con adeguate protezioni, in considerazione della pericolosità di un acido forte concentrato supportato su una sostanza molto fine e quindi facilmente disperdibile in aria.

6.10 *Agente silanizzante*

Soluzione al 10% di dimetildiclorosilano in toluene.

6.11 *Sodio solfito anidro*

6.12 *Sodio idrossido*

6.13 *Allumina basica* tipo 90 (attività II-III, 70-230 mesh), trattata a 250°C per 6 ore e conservata in beuta con tappo a smeriglio, posta in essiccatore in presenza di agenti essiccanti.

6.14 *Agente desolforante*

Sciogliere 9 g di solfito di sodio ed 1 g di idrossido di sodio in un volume sufficiente di acqua distillata (6.2). Estrarre la soluzione due volte in imbuto separatore con un piccolo volume di esano, per rimuovere le eventuali sostanze organiche ed aggiungerla lentamente a 79 g di allumina basica (6.13) in una beuta con tappo a smeriglio (precedentemente lavata con acqua distillata, acetone ed esano, ben asciugata ed esattamente pesata), agitando per garantire la migliore distribuzione. Tappare la beuta ed agitarla manualmente fino a che non è stata eliminata la presenza di grumi nell'allumina. Porre quindi la beuta aperta in stufa e portare (per essiccamento) il contenuto ad un peso finale di 100 g in modo da avere una percentuale di acqua pari all'11% (allumina: 79 g, sodio solfito: 9 g, sodio idrossido: 1 g, acqua: 11 g).

6.15 *Reattivi per perclorazione*

6.15.1 Cloroformio "per analisi pesticidi" (valgono le stesse considerazioni fatte al punto 6 per gli altri solventi).

6.15.2 Acido cloridrico 6 M

6.15.3 Sodio bicarbonato, soluzione al 10% in acqua distillata

La soluzione deve poi essere estratta in imbuto separatore con due aliquote da 50 mL di esano per 500 mL di soluzione), per eliminare le sostanze organiche eventualmente presenti che potrebbero causare interferenze.

6.15.4 Pentacloruro di antimonio

Il prodotto deve essere di elevata purezza. È infatti possibile che contenga tracce di $SbBr_5$ ed in questo caso durante la perclorazione (ad esempio dei PCB) si può formare insieme al decaclorobifenile anche il nonacloromonobromobifenile. È quindi necessario effettuare prove preliminari di perclorazione e scartare le confezioni di pentacloruro di antimonio contaminate.

6.15.5 Carburo di silicio in granuli (circa 20 mesh)

6.16 Soluzioni di riferimento

È opportuno dotare il laboratorio di soluzioni di riferimento delle più comuni miscele di PCB (Aroclor 1016, 1221, 1232, 1242, 1248, 1254 e 1260 o equivalenti). In genere è sufficiente acquistare gli Aroclor 1242, 1254 e 1260 per garantire un'analisi che tenga conto dei principali congeneri nel campione. Se la procedura che si intende utilizzare include la trasformazione dei PCB in decaclorobifenile (DCB) è necessario procurarsi anche un riferimento di questo composto. Per un'analisi completa, secondo le indicazioni di legge, occorre fornirsi anche di miscele di riferimento di PCT disponibili in commercio, anche se, come già detto, la presenza di questi composti nel campione è assai poco probabile. È opportuno inoltre disporre di riferimenti dei pesticidi clorurati indicati nel metodo specifico (5090), per la verifica delle eventuali interferenze derivate da questi composti. Infine, se si intende procedere alla identificazione dei congeneri presenti in quantità significative, è necessario acquistare i riferimenti dei singoli congeneri.

6.16.1 Soluzioni concentrate di PCB

Pesare 0,01 g di miscela di riferimento pura di PCB (esempio Aroclor 1260), trasferirli in un matraccio tarato da 50 mL con n-esano e portare a volume sempre con n-esano (concentrazione finale di circa 200 μg/mL). Le soluzioni devono essere conservate in frigorifero a 4°C e le eventuali variazioni dovute alla evaporazione del solvente possono essere controllate periodicamente per pesata. Le soluzioni di riferimento di PCB in genere restano inalterate per lunghi periodi (almeno 6 mesi).

6.16.2 Soluzioni diluite di PCB

Preparare dette soluzioni diluendo opportunamente le soluzioni concentrate in modo da avere concentrazioni di circa 5 μg/mL, 1 μg/mL e 0,5 μg/mL.

6.16.3 Soluzioni di riferimento di PCT

Vale la stessa procedura di preparazione delle soluzioni concentrate e diluite dei PCB.

6.16.4 Soluzioni di riferimento cumulative

6.16.4.A Soluzione di riferimento di miscele di PCB (esempio Aroclor) 1242, 1254 e 1260.

Prelevare opportune aliquote di soluzioni concentrate (6.16.1) e portare a volume in matraccio tarato da 50 mL con n-esano in modo da ottenere per i singoli Aroclor le concentrazioni di cui al punto 6.16.2. Le soluzioni cumulative così preparate sono utili per il controllo della tecnica di perclorazione e per avere orientamenti sulla eventuale presenza di miscele ben definibili (esempio Aroclor 1242, 1254, ecc.) nel campione in analisi.

6.16.4.B Soluzioni di riferimento di miscele di PCT

Procedere con gli stessi criteri del punto precedente.

6.16.4.C Soluzioni di riferimento di miscele PCB+PCT

Prelevare opportune aliquote di soluzioni concentrate (6.16.1 e 6.16.3) e portare a volume in matraccio tarato da 50 mL con n-pentano in modo da ottenere le concentrazioni di cui al punto 6.16.2 (esempio 5 μg/mL di Aroclor 1242 e 5 μg/mL di Aroclor 5442). Queste soluzioni debbono essere impiegate per il controllo dell'efficacia della separazione cromatografica dei PCB dai PCT, su colonna di gel di silice.

6.16.5 Soluzioni concentrate dei singoli congeneri dei PCB

Pesare 0,01 g di riferimento puro del singolo congenere e solubilizzarlo in n-esano portando a volume in un matraccio tarato da 50 mL (concentrazione finale di circa 200 μg/mL). Le soluzioni devono essere conservate in frigorifero e le eventuali variazioni dovute alla evaporazione del solvente possono essere controllate periodicamente per pesata. Le soluzioni di riferimento di PCB in genere restano inalterate per lunghi periodi (almeno 6 mesi).

6.16.6 Soluzioni diluite dei singoli congeneri dei PCB

Preparare dette soluzioni diluendo opportunamente le soluzioni concentrate (6.16.5) in modo da avere concentrazioni di circa 0,50 μg/mL, 0,10 μg/mL e 0,02 μg/mL.

6.16.7 Soluzioni concentrate di PCB e PCT in acetone

Preparare le soluzioni seguendo le modalità indicate nei punti (6.16.1, 6.16.3 e 6.16.5) sostituendo il n-esano con l'acetone.

6.16.8 Soluzioni diluite di PCB e PCT in acetone

Diluire opportunamente le soluzioni di riferimento (6.16.7), in modo da ottenere, per i vari composti, concentrazioni finali di circa 20 μg/mL. Per effettuare prove di recupero aggiungere ad 1 L di acqua 0,1 mL del riferimento prescelto.

6.16.9 Soluzione concentrata di bifenile (p.m. 154,2) in cloroformio

Sciogliere 0,01 g di bifenile in cloroformio e portare quindi a volume in matraccio tarato da 100 mL (concentrazione finale circa 100 μg/mL).

6.16.10 Soluzione diluita di bifenile in cloroformio

Diluire opportunamente la soluzione (6.16.9), in modo da ottenere una concentrazione finale di 3,09 μg/mL (equivalente a 10 μg/mL come DCB). Questa soluzione può essere utilizzata per controllare la riproducibilità della perclorazione.

6.16.11 Soluzione concentrata di bifenile (p.m. 154,2) in n-esano

Sciogliere 0,01 g di bifenile in n-esano e portare quindi a volume in matraccio tarato da 50 mL (concentrazione finale circa 200 µg/mL).

6.16.12 Soluzioni diluite di bifenile in n-esano

Diluire opportunamente la soluzione 6.16.11 in modo da ottenere soluzioni diluite a concentrazioni di circa 0,5 µg/mL, 1 µg/mL e 2 µg/mL.

6.16.13 Soluzioni concentrate di tetradicloroterfenile (TDCT) (o,m,p; p.m. 712,6) in n-esano

Usare per i tre TDCT la stessa procedura indicata in (6.16.1) per ottenere soluzioni a concentrazione di circa 200 µg/mL.

6.16.14 Soluzioni diluite di TDCT in n-esano

Diluire opportunamente le soluzioni 6.16.13 in modo da ottenere le corrispondenti soluzioni di riferimento secondarie dei singoli TDCT a concentrazioni di 1 µg/mL ed una soluzione cumulativa (o+m+p) avente, per ogni composto, la concentrazione di 1 µg/mL. Queste soluzioni si impiegano per le determinazioni gascromatografiche dei TDCT.

6.16.15 Soluzioni di aldrina in n-esano

Seguire la procedura utilizzata in (6.16.5 e 6.16.6). La soluzione diluita a concentrazione di 0,1 µg/mL può essere usata per il controllo della sensibilità del rivelatore a cattura di elettroni.

6.16.16 Soluzioni di p,p'-DDT (ed eventualmente di altri pesticidi clorurati) in n-esano

Seguire la procedura utilizzata in (6.16.5 e 6.16.6). Le soluzioni diluite possono essere utilizzate per il controllo del frazionamento per cromatografia su gel di silice.

7. Procedimento

7.1 Trattamento preliminare

Se il campione è stato refrigerato, attendere che si equilibri a temperatura ambiente prima dell'estrazione. Controllare l'eventuale presenza di particelle in sospensione ed agitare per consentire la migliore omogeneità.

7.2 Estrazione

Trasferire 500 mL (od un volume minore) di campione in un imbuto separatore da 1 L, aggiungere 60 mL (ridurre a 20-30 mL ed usare un imbuto separatore da 250 mL, se il volume di campione prelevato è di 100 mL) di miscela di diclorometano/n-esano 15:85 (v/v) ed agitare vigorosamente per almeno 3 minuti. Attendere la separazione tra le due fasi. Nel caso di formazione di emulsione, aggiungere una soluzione satura di cloruro di sodio (50-100 mL), agitare ed attendere; se la quantità di emulsione rimane comunque elevata (volume di emulsione pari ad un terzo o più della fase organica) centrifugare o filtrare su lana di vetro. Scaricare la fase acquosa (fase inferiore) in un secondo imbuto separatore e raccogliere la fase organica (fase superiore) per percolazione in colonna di disidratazione su sodio solfato anidro (circa 30 g) in un pallone da 250 mL. Ripetere l'estrazione con due successive aliquote di 60 mL della stessa miscela di solventi, raccogliendo le fasi organiche disidratate su sodio solfato anidro sempre nello stesso pallone da 250 mL. Lavare il sodio

solfato con circa 20 mL di n-esano che vengono raccolti insieme alle altre fasi organiche. Concentrare a piccolo volume (circa 5 mL) mediante evaporatore rotante dotato di bagno termostatico, alla temperatura di 45°C e sotto vuoto moderato (400 mm Hg). Trasferire quantitativamente l'estratto concentrato in una provetta da concentrazione aiutandosi con la minima quantità necessaria di n-esano per i lavaggi del pallone, aggiungere 1 mL di iso-ottano e concentrare sotto flusso di azoto a circa 1 mL, assicurandosi della completa eliminazione del diclorometano.

7.3 Purificazione

Di seguito sono descritte le tecniche di purificazione più idonee per l'eliminazione delle più probabili interferenze. L'analista dovrà decidere se sottoporre l'estratto ad una o più di una delle seguenti procedure. Si consiglia comunque di sottoporre sempre l'estratto alla ripartizione con acetonitrile.

7.3.1 Ripartizione con acetonitrile

Questa procedura è utilizzata per separare grassi ed oli dall'estratto. Trasferire quantitativamente l'estratto in un imbuto separatore da 125 mL con un volume di n-esano sufficiente ad avere un volume finale nell'imbuto di 15 mL. Estrarre il campione per quattro volte con 30 mL di acetonitrile saturo di esano, agitando ogni volta vigorosamente per almeno 3 minuti. Riunire le fasi acetonitriliche in un imbuto separatore da 1000 mL già contenente 700 mL di una soluzione di NaCl al 2%. Mescolare ed estrarre con due aliquote successive di 100 mL di n-esano, agitando vigorosamente ogni volta per almeno 3 minuti. Riunire gli estratti esanici in un imbuto separatore da 1000 mL e lavare con due aliquote successive di 100 mL di acqua distillata. Scartare le acque di lavaggio e disidratare l'esano su solfato di sodio anidro in apposita colonna di disidratazione. Lavare l'imbuto separatore e il sodio solfato con tre porzioni di 10 mL di n-esano, riunendole all'estratto esanico. Concentrare in evaporatore rotante a volume noto (≤10 mL) ed analizzare in gascromatografia. Se è necessario procedere con altre tecniche di purificazione, ridurre prima il volume sotto flusso di azoto fino a 1 mL.

7.3.2 Rimozione dello zolfo elementare

È consigliabile adottare questa purificazione anche se si sospetta una interferenza molto lieve. Riempire una colonna cromatografica (5.5.2) con 7 g di agente desolforante (6.14), trasferire quantitativamente l'estratto concentrato in testa alla colonna ed eluire con 25 mL di esano. Concentrare l'eluato in evaporatore rotante a volume noto (≤10 mL) ed analizzare in gascromatografia. Se è necessario procedere con altre tecniche di purificazione, ridurre prima il volume, sotto flusso di azoto, fino a 1 mL.

7.3.3 Cromatografia su gel di silice attivato

L'estratto purificato può essere sottoposto a cromatografia su gel di silice attivato per la separazione dei PCB dai PCT.

7.3.3.A Taratura dell'adsorbente

La cromatografia su gel di silice attivato (100-200 mesh) (6.7) viene effettuata per completare il procedimento di purificazione dell'estratto e per ottenere la separazione dei PCB dai PCT in due frazioni in modo da facilitarne l'identificazione gascromatografica.
È opportuno che ogni lotto di gel di silice ricevuto sia controllato per la riproducibilità della separazione secondo il procedimento seguente: da un lotto di gel di silice, conservato in un recipiente di vetro ermeticamente chiuso, prelevarne 60-80 g ponendoli in una larga capsula di porcellana e mantenerli in una stufa ad aria a 200°C per 8 ore (per l'attivazione dell'adsorbente è opportuno impiegare una stufa ad aria diversa da quella che si utilizza per il trattamento della vetreria). Il gel così attivato va conservato, in recipienti di vetro ermetica-

mente chiusi, in essiccatore e normalmente conserva le sue caratteristiche per 10-15 giorni.
Nella parte inferiore della colonna cromatografica (5.5.2) pressare un batuffolo di lana di quarzo ed immettere 20 mL di n-pentano (chiudendo la parte inferiore della colonna) e poi 4 g di gel di silice attivato. Chiudere con un tappo a smeriglio la parte superiore della colonna, rovesciarla 2-3 volte e far depositare il gel di silice in modo da evitare la formazione di bolle d'aria. Iniziata la discesa del solvente, con piccoli quantitativi di n-pentano lavare le pareti della colonna per trasportare in basso tutto il gel di silice e successivamente, non appena il livello del solvente sta per raggiungere quello superiore dell'adsorbente, immettere nella colonna 2 mL del riferimento (in n-pentano) di PCB+PCT e far adsorbire. Collegare il serbatoio riserva solventi ed eluire con 130 mL di n-pentano e, successivamente, con 60 mL di benzene.
Il flusso dei solventi deve essere di circa 2-3 mL/minuto e può essere ottenuto applicando una lieve pressione nella colonna. Al termine della cromatografia concentrare le due frazioni in evaporatore rotante fino a pochi millilitri e portarle quasi a secchezza con debole flusso di azoto, a temperatura ambiente. Portare infine a un volume noto con n-esano ed esaminare i due eluati concentrati mediante gascromatografia. Per il corretto uso della colonna cromatografica l'efficacia della separazione (PCB nella prima frazione, PCT nella seconda) dovrebbe essere almeno del 95%. Se non si ottiene questo risultato variare opportunamente i volumi degli eluenti.

7.3.3.B Cromatografia del campione

Prima di procedere alla cromatografia su colonna del campione da analizzare, è opportuno ricavare almeno un tracciato gascromatografico complessivo dell'estratto diluito per avere un'idea orientativa delle sostanze presenti e delle loro quantità approssimative. Infatti, in caso di campioni molto contaminati l'estratto deve essere opportunamente diluito e la cromatografia su colonna effettuata su un'aliquota della soluzione risultante dalla diluizione. Usando la stessa tecnica utilizzata per la taratura dell'adsorbente immettere nella colonna cromatografica la soluzione di 2 mL in n-pentano del campione in analisi e far adsorbire; quindi effettuare due lavaggi del contenitore, ognuno con 2 mL di n-pentano e far adsorbire anche queste quantità.
Eluire poi con n-pentano (130 mL) e benzene (60 mL), oppure con i volumi più opportuni determinati nelle prove di controllo dell'adsorbente (utilizzare sempre contenitori separati per ciascun solvente al fine di non alterare la polarità). Il flusso dei solventi deve essere di circa 2-3 mL/minuto e può essere ottenuto applicando una lieve pressione nella colonna. Al termine della cromatografia concentrare le due frazioni in evaporatore rotante fino a pochi millilitri e portare quasi a secchezza con debole flusso di azoto, a temperatura ambiente. Portare infine a volume noto con n-esano ed esaminare i due eluati concentrati mediante gascromatografia.

7.3.4 Procedura semplificata di purificazione (trattamento con acido solforico e silice)

In considerazione della resistenza dei PCB a trattamenti con acido concentrato, spesso, specialmente per matrici biologiche, i metodi riportati in letteratura riportano la metodica descritta di seguito, che può essere utilizzata anche per il trattamento di estratti di acqua di scarico, consentendo una sufficiente purificazione dell'estratto stesso. Con questo trattamento si perdono per degradazione chimica alcuni pesticidi clorurati, ma per la determinazione dei soli PCB questo non costituisce un problema.
Trasferire l'estratto esanico concentrato (circa 1 mL) in provetta da reazione, lavando con altre piccole aliquote di esano. Aggiungere 1 mL di acido solforico concentrato, chiudere accuratamente la provetta ed agitare vigorosamente. Separare le due fasi (preferibilmente per centrifugazione) e prelevare la fase esanica concentrandola ad 1 mL. Una ulteriore purificazione si può ottenere trasferendo l'estratto trattato con acido solforico su una colonna cromatografica (5.5.2) riempita con 3 g di silice (6.8) ed eluendo con 20 mL di una miscela esano/benzene 95:5 (v/v). L'eluato, concentrato al volume desiderato, viene analizzato per gascromatografia. In alternativa, la procedura descritta può essere semplificata trasferendo l'estratto esanico del campione in testa ad una colonna cromatografica (5.5.2) riempita con 10 g di silice/acido solforico 60:40 (p/p) (6.9.1) ed eluendo con 30 mL di esano. L'eluato, concentrato al volume desiderato, viene analizzato per gascromatografia.

Nota: *le procedure di purificazione indicate in questo paragrafo rappresentano una alternativa a quelle descritte in precedenza e sono relativamente più semplici e rapide.*
La letteratura scientifica ne riconosce la validità e, se l'analisi è limitata ai soli PCB, possono essere adottate senza problema.

7.4 Tecniche di perclorazione

7.4.1 Perclorazione dei PCB a DCB (decaclorobifenile)

7.4.1.A Controllo dell'efficacia della perclorazione

L'efficacia della perclorazione (resa % della conversione dei PCB a DCB) può essere controllata sia a partire da soluzioni di riferimento di diversi Aroclor (6.16.2) o da loro miscele a concentrazione nota (6.16.4.A), sia a partire da una soluzione di riferimento di bifenile (6.16.10). La perclorazione del solo bifenile, essendo più rapida di quella dei PCB, è utile anche per controllare il grado di purezza del pentacloruro di antimonio impiegato (assenza del corrispondente pentabromuro).

7.4.1.B Perclorazione dei PCB

Immettere in ogni tubo per perclorazione (Fig. 4) volumi di 1-2 mL delle soluzioni di riferimento in n-esano di PCB calcolando i quantitativi teoricamente equivalenti di DCB (si può procedere, ad esempio, secondo uno schema simile a quello riportato in Tab. 4). Aggiungere ad ogni tubo da perclorazione 2 granelli di carburo di silicio (6.15.5) e 4-5 gocce di cloroformio concentrando poi su bagno ad acqua, con cautela, a circa 0,1 mL (attenzione alla fuoriuscita dei solventi per ebollizione). Dopo raffreddamento a temperatura ambiente, aggiungere 2 mL di cloroformio e concentrare ancora a 0,1 mL; raffreddare e ripetere un'altra volta questo procedimento. Occorre porre attenzione a tali fasi di evaporazione che portano anche ad eliminare il bifenile eventualmente presente nel campione. Se il campione è perclorato, è possibile falsare completamente il dosaggio dei PCB.

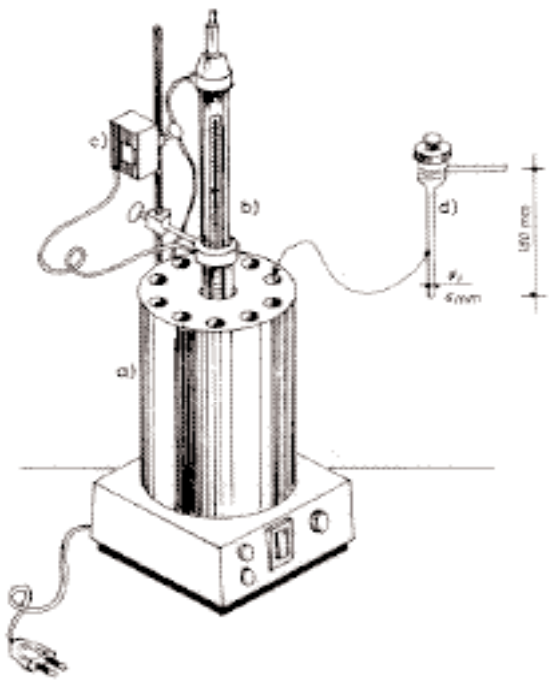


Figura 4: Tubo di perclorazione e blocco riscaldante. a) blocco di alluminio; b) termometro immerso in bagno di paraffina; c) "relais"; d) tubo di perclorazione.

Tabella 4: Valutazione dell'efficacia della perclorazione per la conversione dei PCB a DCB*

Miscele di PCB perclorate in µg			Equivalenti teorici in µg	DCB ottenuto % del teorico** µg
Fenclor42	Fenclor 54	Fenclor 60		
10,7	-	-	20,8	87,7
-	10,3	-	15,8	94,5
-	-	10,6	14,7	92,7
3,6	3,4	3,5	17,2	114,4
3,6	1,7	5,3	16,9	108,7
3,6	5,2	1,8	17,4	92,7
5,4	1,7	3,6	18,0	103,5
1,8	3,4	5,3	16,0	82,8
1,8	5,2	3,6	16,4	105,9

(*) Calcoli effettuati sulla base dei seguenti pesi molecolari medi stimati: Fenclor 42 = 257,5; Fenclor 54 = 326,4; Fenclor 60 = 361
(**) Valore medio = 98,1 µg; scarto tipo = 10,5 µg; minimo e massimo = 82,8 µg e 114,4 µg

Immettere nei tubi di perclorazione, (sotto cappa), circa 0,2 mL di pentacloruro di antimonio (6.15.4); chiudere ermeticamente con le apposite valvole e lasciare per 15-18 ore nel bagno a secco a 175-180°C. Terminata la perclorazione, lasciar raffreddare prima a temperatura ambiente e poi, per qualche minuto, in bagno a ghiaccio procedendo poi, sotto cappa, all'apertura della valvola del tubo. Trasferire quantitativamente il campione perclorato in un imbuto separatore da 60 mL riprendendo con 5 mL di HCl 6 M (6.15.2) e poi con 15 mL di n-esano (6.1.1). Agitare e lasciare separare le fasi, immettendo quella acida in un altro imbuto separatore e procedendo ad altre due estrazioni, ogni volta con 15 mL di n-esano.
Sottoporre gli estratti riuniti di n-esano ai seguenti lavaggi: per due volte con 20 mL di acqua distillata, poi con 20 mL di $NaHCO_3$ al 10% (6.15.3) ed infine per due volte con 20 mL di acqua distillata, scartando sempre le soluzioni di lavaggio. Filtrare la soluzione di n-esano su una colonna per disidratazione (5.6.1) contenente circa 10 g di Na_2SO_4 anidro (6.4) e, al termine, lavare l'imbuto separatore e la colonna con 60-70 mL di n-esano, riunendo le soluzioni. Concentrare le soluzioni riunite ad 1 mL, mediante l'apposito evaporatore rotante e sotto vuoto leggero, per le successive determinazioni gascromatografiche del DCB.

7.4.1.C Perclorazione del bifenile

La resa esatta della perclorazione può essere controllata a partire da quantità note di bifenile in cloroformio, immettendo nel tubo da perclorazione 0,1 mL della soluzione di riferimento diluita di bifenile.
In questo caso non si deve procedere alle successive diluizioni ed evaporazioni della soluzione, procedendo senz'altro con l'aggiunta del pentacloruro di antimonio e quindi con la reazione ed i lavaggi come riportato sopra e con la valutazione gascromatografica del DCB.

7.4.1.D Perclorazione del campione

La prima frazione di eluizione del gel di silice (7.3.3.B) (che contiene i PCB), evaporata e ripresa con un 1 mL di n-esano, viene immessa nel tubo per perclorazione e quindi trattata esattamente come descritto in 7.4.1.B (perclorazione dei PCB). Procedere quindi ai lavaggi ed all'analisi gascromatografica.

7.4.2 Perclorazione dei PCT a TDCT (o, m, p)

7.4.2.A Controllo dell'efficacia della perclorazione

Come già visto per i PCB, anche in questo caso l'efficacia della perclorazione può essere controllata a partire da soluzioni di riferimento di PCT. La perclorazione e l'isolamento dei TDCT vengono effettuate in modo completamente analogo a quanto già descritto in 7.4.1.A) e la

resa di conversione a TDCT è normalmente superiore al 95%. Poichè i PCT sono costituiti da miscele dei tre isomeri del terfenile (o, m, p), presenti approssimativamente nel rapporto 1:4:2, in tale rapporto orientativo si rinverranno anche i tre isomeri TDCT che verranno valutati mediante gascromatografia.

7.4.2.B Perclorazione del campione

La seconda frazione di eluizione del gel di silice (7.3.3.B) (che contiene i PCT), evaporata e ripresa con 1 mL di n-esano viene immessa nel tubo per perclorazione e quindi trattata esattamente come descritto in 7.4.1.A) (perclorazione dei PCB). Procedere quindi ai lavaggi e all'analisi gascromatografica.

7.5 Determinazioni gascromatografiche

Si consiglia di utilizzare una colonna capillare con fase non polare ed un rivelatore di massa, o in assenza di questo, di un rivelatore e cattura di elettroni (ECD).
Si riportano di seguito le condizioni operative e, a titolo di esempio, i relativi cromatogrammi ottenuti con alcune delle colonne consigliate (Figg. 5A-E, 6A-C). Ovviamente i dati riportati sono indicativi e l'analista deve verificare i parametri con la strumentazione e le condizioni operative effettivamente utilizzate.
Per la verifica della riproducibilità della risposta del rivelatore, ripetere almeno tre volte l'iniezione di una sostanza di riferimento (esempio: aldrina).

7.6 Determinazione gascromatografica con rivelatore di massa

L'uso della GC/MS per l'analisi quantitativa dei PCB presenta delle caratteristiche peculiari:

- possibilità di distinguere fra livelli di clorurazione differenti;
- maggiore uniformità dei fattori di risposta all'interno delle classi isomeriche in confronto con quanto avviene con il rivelatore ECD;
- maggiore sensibilità per i congeneri a basso livello di clorurazione (contrariamente all'ECD, la cui risposta è ovviamente funzione del numero e posizione degli atomi di cloro).

L'uso della GC/MS consente quindi una semplificazione nel riconoscimento dei singoli isomeri, generando di converso una notevole mole di dati (spettri di massa) che necessita di adeguati mezzi e metodi di trattamento.
Nella letteratura più recente è possibile reperire informazioni dettagliate sul comportamento cromatografico dei PCB su molte colonne capillari così come diversi schemi di acquisizione ed interpretazione dei dati. In linea teorica è possibile l'identificazione di tutti i congeneri con l'uso di adeguati programmi di temperatura e di tecniche di accoppiamento di due colonne a polarità differente. È inoltre oggi possibile reperire il riferimento di ogni congenere e quindi, sempre in linea teorica, operare una analisi quantitativa molto accurata. D'altra parte questo livello di dettaglio, se può essere di estremo interesse per indagini sul destino ambientale dei PCB, è sicuramente eccessivo per analisi di controllo di acque di scarico, soprattutto in considerazione dei tempi di analisi e dei costi conseguenti. Il sistema analitico più adeguato alle esigenze della presente metodica prevede comunque l'uso di una colonna capillare non polare (tipo SE-54) e di una soluzione il riferimento di congeneri (ad esempio quella riportata per i metodi EPA 525 o 625) contenente un singolo congenere per ogni classe isomerica, scelto in modo da rappresentare adeguatamente il valore medio del fattore di risposta per la classe isomerica rappresentata. In questo caso la scelta oculata nonché ovviamente la purezza delle soluzioni di riferimento usate è maggiormente critica rispetto all'utilizzazione di miscele di Aroclor commerciali.
La tecnica di acquisizione dei dati è generalmente SIM (Selected Ions Monitoring), in cui vengono misurati soltanto alcuni valori di m/z caratteristici delle sostanze di interesse.
La modalità di frammentazione dei congeneri dei PCB in condizioni di impatto elettronico (EI)

è piuttosto semplice. Il "cluster" isotopico dello ione molecolare è comunque il più abbondante, seguito da quello relativo alla perdita di due atomi di cloro (ovviamente a partire dai diclorurati). Per i congeneri aventi due o più atomi di cloro adiacenti è rilevabile un "effetto orto" con perdita di HCl.
La ionizzazione chimica (CI) in ioni positivi porta alla formazione dello ione molecolare protonato con scarsissima o nulla frammentazione e può risultare utile in presenza di rilevanti quantità di sostanze interferenti. Quella in ioni negativi (NICI), oltre alla scarsa frammentazione, presenta livelli di sensibilità comparabili con l'ECD per i composti con elevata affinità elettronica.
L'analisi dei PCB in acque di scarico mediante GC/MS non presenta particolari problemi di sensibilità, o necessità di utilizzare spettrometri di massa ad alta risoluzione (quali quelli a settore magnetico), come per esempio nell'analisi di diossine. Il tipo di rivelatore di massa più adatto in termini di praticità di utilizzo, facile manutenzione, robustezza e ridotti costi di esercizio è quello a quadrupolo, sia classico che in configurazione "ion-trap", operando in condizioni di ionizzazione per impatto elettronico a 70 eV.
L'acquisizione dei dati in SIM dovrebbe essere ottimizzata sulla base delle informazioni ricavabili in letteratura sul comportamento cromatografico dei PCB. Come precedentemente accennato, la colonna capillare più usata per questa analisi è del tipo metil-5%fenilsiliconico (SE-54 ed equivalenti) ed esistono in commercio miscele di congeneri specificatamente formulate per la definizione delle "finestre" di eluizione delle singole classi isomeriche. Di seguito vengono indicati i primi e gli ultimi congeneri ad essere eluiti per le varie classi isomeriche.

Classe	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
primo CB	1	10	19	54	104	155	188	202	208	209
ultimo CB	3	15	37	77	126	169	189	205	206	209

Le possibilità di scelta per le masse da acquisire in SIM sono varie ed esistono in letteratura schemi più o meno complessi in funzione del livello di confidenza desiderato per l'identificazione dei composti e dell'uso più o meno spinto delle informazioni cromatografiche pregresse (es. tRR).
In generale, il requisito minimo è che vengano acquisiti per ogni classe isomerica almeno due valori di m/z dal "cluster" isotopico dello ione molecolare: uno per la quantificazione e l'altro per la conferma della identificazione. In questo caso esiste la possibilità di interferenza positiva da parte di congeneri a più alto livello di clorurazione (in particolare con 2 atomi di cloro in più). Tale interferenza può essere eliminata facendo ricorso ai dati cromatograflci noti in letteratura o acquisendo contemporaneamente altri m/z diagnostici: nel primo caso il sistema di interpretazione dei dati sarà dipendente dal sistema cromatografico adottato (con il vantaggio di una relativa semplicità di applicazione), nel secondo caso si avrà un sistema relativamente svincolato dalla parte cromatografica, con la conseguenza di una maggiore complessità interpretativa e di una riduzione di sensibilità (maggior numero di m/z da acquisire contemporaneamente).
In Tab. 4 viene riportato un tipico programma di acquisizione in SIM relativamente ai vari congeneri.
In Fig. 5 sono riportati i cromatogrammi ionici (per classi isomeriche) relativi ad una miscela 1:1:1:1:1:1 di Aroclor 1016, 1221, 1232, 1242, 1248, 1254. Non essendo presente l'Aroclor 1260 nella miscela sono prevalenti i composti a più basso livello di clorurazione.

Tabella 4: Programma di acquisizione in SIM relativamente ai vari congeneri. Gli intervalli dei tempi di ritenzione riportati sono soltanto indicativi (con riferimento alle condizioni cromatografiche utilizzate)

Intervallo dei tempi di ritenzione (min)	7-12	12-15	15-19	19-26	26-30	30-35	35-40	>40
classi isomeriche	mono/di	di/tri/ tetra	tri/tetra/ penta	tetra/ penta/esa	penta/esa epta	esa/ epta/otta	otta/nona	deca
m/z	188,05	222,00	255,95	289,90	325,90	359,85	427,75	495,70
	190,05	224,00	257,95	291,90	327,90	361,85	429,75	497,70
	222,00	255,95	289,90	325,90	359,85	393,80	431,75	499,70
	224,00	257,95	291,90	327,90	361,85	395,80	461,70	
		289,90	325,90	359,85	393,80	427,75	463,70	
		291,90	327,90	361,85	395,80	429,75	465,70	

7.7 Determinazione gascromatografica con rivelatore ECD

Si consiglia di utilizzare soluzioni di riferimento che contengano un congenere per ogni classe isomerica, in modo da poter valutare, in prima approssimazione, la risposta del rivelatore in relazione agli atomi di cloro presenti in molecola.
Le concentrazioni delle soluzioni di riferimento utilizzate dovrebbero essere tali che ad 1 µL di soluzione iniettato corrispondano quantità di clorobifenile comprese nell'intervallo 20-500 pg, assunto preliminarmente come intervallo di linearità del rivelatore.
Non è necessario per i PCB determinare la curva di taratura per ogni singolo congenere. È sufficiente che la miscela di taratura contenga un congenere per ogni classe isomerica: la loro risposta può essere considerata rappresentativa dell'intera classe isomerica (anche se la risposta dell'ECD varia anche all'interno della stessa classe isomerica). Alternativamente la curva di taratura si può costruire utilizzando i picchi più rappresentativi di soluzioni di riferimento di PCB (Aroclor 1242, 1254 e 1260).
Scelte le condizioni operative, controllata la stabilità strumentale e la sensibilità del rivelatore si può passare all'analisi gascromatografica del campione estratto ed opportunamente concentrato, in modo che i picchi delle sostanze da analizzare entrino nell'intervallo di linearità. In Fig. 6 sono riportati i relativi gascromatogrammi dell'Aroclor 1254, dell'Aroclor 1260 e di una miscela di Aroclor 1254 + Aroclor 1260.

7.8 Analisi quantitativa

Iniettare 1 µL di estratto purificato e concentrato del campione analizzato. Valutare qualitativamente la presenza di PCB ed identificare orientativamente la miscela (esempio Aroclor 1242, 1254 o 1260) eventualmente presente. Iniettare quindi 1 µL di esano per verificare che non compaiano picchi dovuti a residui dalle precedenti iniezioni. Iniettare 1 µL della soluzione standard della/delle miscele di PCB eventualmente identificate nel campione. La concentrazione della soluzione di riferimento deve essere dello stesso ordine di grandezza della concentrazione valutata nel campione. Iniettare quindi tre volte il campione e successivamente altre due volte la soluzione di riferimento. I policlorobifenili si presentano nei campioni reali in miscele di varia complessità e con una distribuzione dei congeneri non sempre eguale a quella delle soluzioni di riferimento, per cui è impossibile descrivere un metodo semplice per la loro determinazione quali-quantitativa. Si riportano qui di seguito i criteri di base di alcuni dei metodi che possono essere utilizzati.

7.8.1 Caso 1

Il caso in cui è evidente nel campione la presenza di una sola miscela (ad esempio Aroclor 1260) con le stesse percentuali dei diversi congeneri della soluzione di riferimento, è il più semplice che si possa incontrare. In questo caso, si può confrontare il cromatogramma del campione con quello della soluzione di riferimento corrispondente e misurare la somma del-

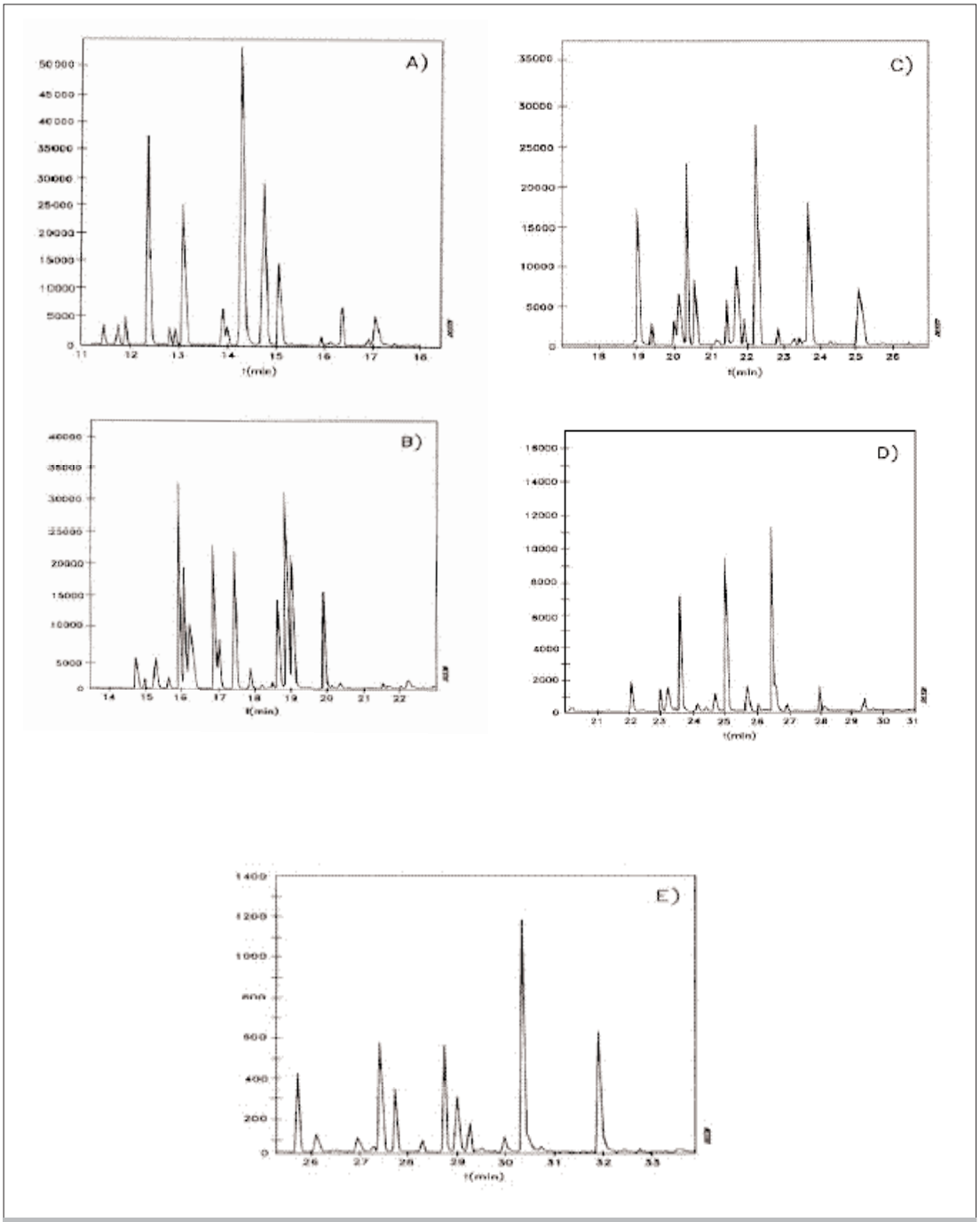


Figura 5: Cromatogrammi ionici relativi a triclorobifenili (A), tetraclorobifenili (B), pentaclorobifenili (C), esaclorobifenili (D) ed eptaclorobefenili (E). Condizioni strumentali: rivelatore di massa quadrupolare con ionizzazione EI a 70 eV; gas di trasporto: elio (120 KPa di pressione in testa alla colonna capillare); colonna: metil-5%fenilsilicone (0,2 mm diametro interno, 0,11 µm spessore di fase, 25 m lunghezza); iniettore: "splitless" (260°C, 1 min); programma di temperatura: 80°C per 2 min, 15°C/min fino a 150°C per 1 min, 3°C/min fino a 260°C; temperatura della linea di trasferimento: 280°C.

le aree dei picchi dei diversi congeneri nel campione e nella soluzione di riferimento, calcolando il risultato nel seguente modo:

$$C = \sum (Ac/As_i) \frac{Q_s \cdot V_f}{V_i \cdot V_e}$$

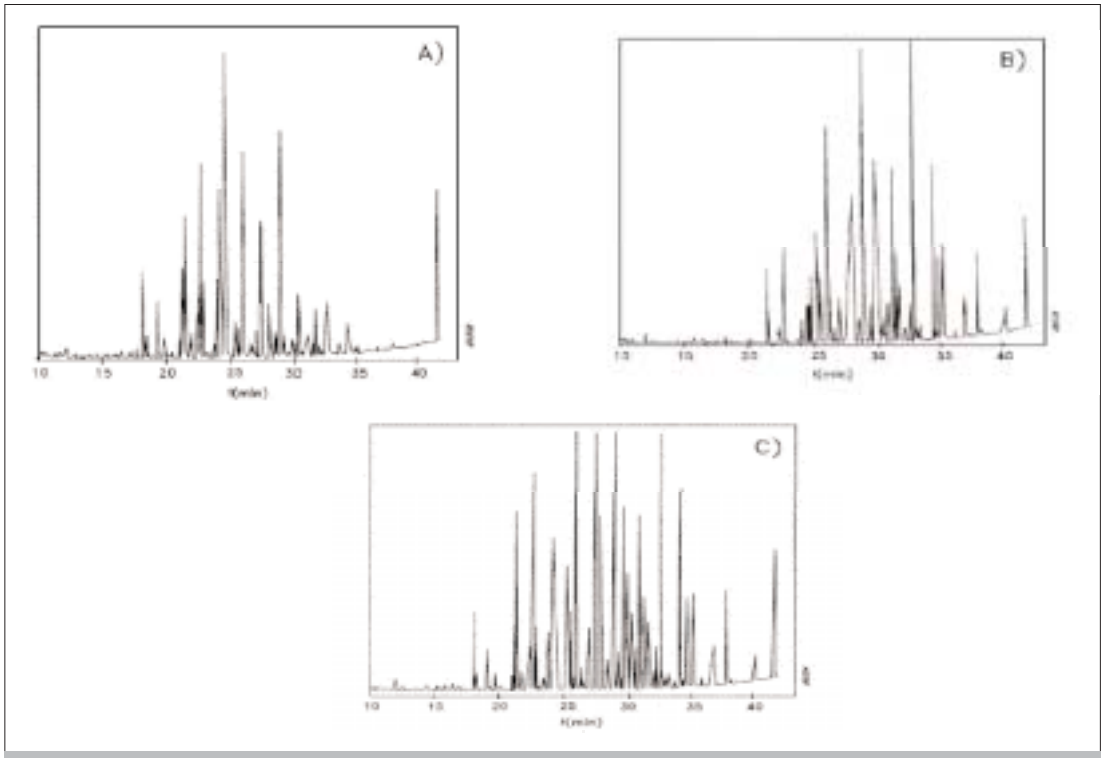


Figura 6: Gascromatogrammi di Aroclor 1254 (A), Aroclor 1260 (B) e di una miscela di Aroclor 1254+Aroclor 1260 (C). Decaclorobifenile addizionato in tutti i campioni su colonna capillare SPB5 (lunghezza: 25 m, d.i. 0,2 mm, spessore del film: 0,25 μm). Condizioni cromatografiche utilizzate: temperatura iniettore 240°C (splitless 1 min); programma di temperatura 80°C per 2 min, quindi fino a 150°C a 15°C/min, 150°C per 1 min e fino a 260°C a 3°C/min; gas di trasporto elio.

dove:
C = concentrazione (μg/L) di PCB;
As_i = area del generico picco (i) nel riferimento;
Ac_i = area del corrispondente picco (i) nel campione;
Q_s = quantità (ng) di soluzione di riferimento iniettata;
V_f = volume finale (μL) dell'estratto;
V_i = volume (μL) di campione iniettato;
V_c = volume (mL) di campione sottoposto all'analisi.

Per il calcolo della concentrazione ("PCB totali") si può procedere anche nel seguente modo. Iniettare una quantità nota di una soluzione di riferimento di una miscela ("Aroclor x"), che si ritiene abbia il tracciato cromatografico più simile a quello del campione. Calcolare i tempi di ritenzione relativi (tRR) rispetto al p,p'-DDE nella soluzione di riferimento. Misurare l'area di ciascun picco e calcolare il fattore di risposta (R) per ogni singolo picco (singolo congenere o somma di congeneri non separabili cromatograficamente) nel seguente modo:

$$R_i = \frac{Q_s \cdot M_i/100}{A_i}$$

dove:
R_i = fattore di risposta (ng/area) del/dei congeneri, relativi al picco (i);
Q_s = quantità (ng) di miscela di riferimento iniettata;
M_i = media ponderale (%) del/dei congeneri, relativi al picco (i) nella soluzione di riferimento;
A_i = area del picco (i).

Calcolare i tRR e l'area di ciascun picco nel campione. Confrontare il cromatogramma del campione con quelli della soluzione di riferimento e calcolare la quantità relativa ad ogni picco preso in considerazione:

$$Q(i) = R_i \cdot A_{ic}$$

dove:
Q_i = quantità (ng) relativa al picco (i) considerato;
R_i = fattore di risposta del congenere, relativi al picco (i);
A_{ic} = area del picco nel campione.

Addizionare le quantità (ng) relative a tutti i picchi considerati e calcolare la concentrazione nel campione:

$$C = \sum \frac{Q(i) \cdot V_e}{V_c \cdot V_i}$$

dove:
C = concentrazione (µg/L) di PCB;
$\sum Q(i)$ = somma delle quantità relative ad ogni singolo picco considerato;
V_e = volume (µL) di estratto;
V_c = volume (mL) di campione estratto;
V_i = volume (µL) di estratto iniettato.

7.8.2 Caso 2

Nelle situazioni più complesse quali:

- la presenza nel campione di più miscele (esempio Aroclor 1242+1254+1260) con i singoli congeneri alle stesse percentuali con cui sono presenti nelle soluzioni di riferimento;
- la presenza nel campione di più miscele (esempio Aroclor 1242+1254+1260) con i singoli congeneri a percentuali diverse da quelle con cui sono presenti nelle soluzioni di riferimento;
- la combinazione dei due casi precedenti;

l'accuratezza del metodo di calcolo decresce quanto più è alto il grado di alterazione rispetto alla distribuzione dei congeneri nelle soluzioni di riferimento. Se il campione presenta la stessa distribuzione dei congeneri della/delle soluzioni di riferimento, il calcolo effettuato come in 7.8.1 è infatti relativamente accurato. In caso contrario, la variabilità del dato finale è elevata, soprattutto nel caso in cui si debba utilizzare, in assenza di spettrometri di massa, il rivelatore a cattura di elettroni (ECD), che presenta fattori di risposta estremamente variabili e relativi al numero e posizione di sostituzione degli atomi di cloro nella molecola.
L'utilizzazione di un rivelatore di massa, aumentando la possibilità di identificare correttamente i singoli congeneri, aumenta di conseguenza l'attendibilità del dato quantitativo finale. Occorre comunque tenere presente che se il dato viene espresso come concentrazione nel campione di un "Aroclor x", questo significa che l'analista ritiene che il tracciato cromatografico del campione è significativamente più simile a quello dell'"Aroclor x" che a quelli degli altri Aroclor e quindi l'analisi è stata effettuata prendendo come riferimento una soluzione di riferimento di "Aroclor x".
In alternativa, se è possibile operare con una colonna capillare con adeguato programma di temperatura e se sono disponibili le soluzioni di riferimento dei singoli congeneri più abbondanti si può procedere alla identificazione e quantificazione dei congeneri stessi nel campione analizzato ed esprimere il risultato sommandone le quantità.

7.8.3 Metodo basato sulla perclorazione

Il limite più evidente della tecnica di perclorazione è l'impossibilità di avere informazioni sulle concentrazioni dei singoli congeneri e sulla miscela responsabile della contaminazione. D'altra parte, vi è il vantaggio che la determinazione non è influenzata da alcuna delle interferenze che si possono incontrare in un campione di acqua, ad eccezione della eventuale presenza del bifenile nel campione.
Si ricorda ancora che il dato quantitativo viene espresso come DCB (decaclorobifenile) originato dalla perclorazione di tutti i clorobifenili presenti nel campione ed è quindi necessario, per una sua corretta valutazione, specificare che è stata adottata la tecnica della perclorazione per l'analisi.

Nota: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".*
Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

BIBLIOGRAFIA

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIAL: D 3534 (1981), "*Tentative Test Method for Polychlorinated Biphenyls (PCB's) in Water*".

Decreto Legislativo 152/99, Disposizioni sulla tutela delle acque dall'inquinamento e recepimento della direttiva 91/271/CEE concernente il trattamento delle acque reflue urbane e della direttiva 91/676/CEE relativa alla protezione delle acque dall'inquinamento provocato dai nitrati provenienti da fonti agricole, *G. U. n. 124, 29 maggio 1999, Supplemento Ordinario n. 101/L.*

JAPENGA J., WAGENAAR W.J., SMEDES F. & SALOMONS W. (1987): "A new, rapid clean-up procedure for the simultaneous determination of different groups of organic micropollutants in sediments; application in two european estuarine sediment studies", *Environ. Technol. Lett.*, **8**, 9.

LEONI V., CREMISINI C., CASUCCIO A. & GULLOTTI A. (1991): "The separation of pesticides and related compounds, polychlorobiphenyls and other pollutants into four groups by silica gel microcolumn chromatography (Application to surface water analysis)", *Pestic. Sci.*, **31**, 209-220.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1982): "Method 617, *The Determination of Organohalide Pesticides and PCBs in Municipal and Industrial Wastewater*".

5120. Richiesta biochimica di ossigeno (BOD_5)

Il saggio del BOD (Biochemical Oxygen Demand) esprime la quantità di ossigeno necessaria per l'ossidazione biochimica delle sostanze contenute in un'acqua nelle condizioni in cui viene eseguito il saggio stesso. Detta determinazione tende a riprodurre, in laboratorio, le condizioni che si possono verificare normalmente nei corpi idrici e negli impianti di depurazione di tipo biologico.
La richiesta di ossigeno è dovuta generalmente a tre classi di sostanze: composti organici, i cui atomi di carbonio vengono utilizzati dai microrganismi come alimento per le varie attività vitali (accrescimento, respirazione, riproduzione); composti ossidabili dell'azoto, utilizzati come fonte energetica da batteri specifici come ad esempio il Nitrosomonas e il Nitrobacter; sostanze inorganiche, come ad esempio ferro (II), solfuri e solfiti, che vengono facilmente ossidate dall'ossigeno presente nelle acque.
Le sostanze appartenenti alle prime due classi consumano ossigeno attraverso meccanismi biochimici, mentre quelle appartenenti alla terza classe generalmente attraverso processi chimici.
La determinazione può essere effettuata con metodi chimici, fisici ed elettrochimici.
I metodi chimici, di cui si riferisce nel seguito, possono essere eseguiti in qualunque laboratorio, senza l'impiego di particolari apparecchiature.
La condizioni operative per la determinazione del BOD_5 con metodi chimici devono essere stabilite di volta in volta, in relazione alla natura e alla concentrazione delle sostanze ossidabili, nonchè alla presenza di un idoneo consorzio batterico.
Ciò premesso, a seconda del tipo di campione da analizzare, si adotterà uno dei seguenti metodi.

METODO A - Determinazione diretta

1. Principio del metodo

Il metodo si basa sulla determinazione dell'ossigeno disciolto nel campione da analizzare prima e dopo incubazione di cinque giorni, al buio ed alla temperatura di 20°C.
La differenza fra le due determinazioni dà il valore del BOD_5 del campione, espresso in mg/L di ossigeno.

2. Campo di applicazione

Il metodo può essere applicato ad acque naturali e di scarico poco inquinate, aventi un BOD_5 inferiore a 5 mg/L, purchè non siano presenti sostanze inibitrici, i valori di pH siano compresi tra 6,5 ed 8,3 e sia garantito un adeguato consorzio batterico.

3. Interferenze e cause di errore

Interferiscono positivamente tutte quelle sostanze che vengono ossidate chimicamente dall'ossigeno disciolto; l'interferenza può comunque essere valutata in termini numerici a condizione che la reazione di ossidazione venga supposta completa.

Ad esempio. nel caso di nitriti, ferro (II), solfuri e solfiti, che vengono rispettivamente ossidati a nitrati, ferro (III), zolfo e solfati, l'interferenza risulta pari a:

- 1 mg di nitriti (come azoto) = 1,14 mg di ossigeno;
- 1 mg di ossido di ferro (II) = 0,12 mg di ossigeno;
- 1mg di idrogeno solforato = 0,47 mg di ossigeno;
- 1 mg di acido solforoso = 0,20 mg di ossigeno.

Interferenze negative possono essere provocate dalla presenza di cloro libero o metalli tossici a causa della loro azione inibitrice. Analoga azione inibitrice è causata da valori di pH inferiori a 6,5 o superiori a 8,3.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il prelievo e la conservazione del campione debbono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".
Si raccomanda di effettuare la determinazione del BOD_5 entro il minor tempo possibile dal prelievo del campione, onde evitare di ottenere valori in difetto conseguenti all'attività batterica. Ove ciò non sia possibile, occorre conservare il campione a 3-4°C per un periodo non superiore a 24 ore.

5. Apparecchiature

Attrezzatura di uso comune in laboratorio, e:

5.1 Bottiglie di incubazione, della capacità di 300 mL (±1,5 mL), fornite di tappo a smeriglio a tenuta, numerate sul corpo e sul tappo e dotate di idonea svasatura per garantire la tenuta idraulica. Il volume di ciascuna bottiglia nel caso in cui non si disponga di bottiglie tarate deve essere determinato a 20°C e annotato.

5.2 Termostato, da usare a 20°C, regolabile a ±1°C.

5.3 Compressore o bombola di aria compressa

Purificare l'aria per passaggio attraverso una bottiglia di lavaggio contenente acqua o ricorrendo ad altri dispositivi atti ad eliminare eventuali impurezze.

5.4 Setto poroso per l'aerazione

6. Reattivi

Utilizzare soltanto acqua distillata o deionizzata e reattivi di grado analitico.

6.1 Soluzione alcalina di ioduro di potassio e sodio azide

Sciogliere rapidamente 500 g di idrossido di sodio (NaOH), posti in una beuta da 1000 mL munita di tappo di gomma, in 250 mL di acqua e raffreddare a temperatura ambiente, addizionare 150 g di ioduro di potassio (KI) e diluire a circa 800 mL.
Aggiungere lentamente alla soluzione fredda, sotto continua agitazione, 10 g di sodio azide (NaN_3) previamente disciolti in 40 mL di acqua. Travasare quantitativamente in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua. Conservare in bottiglia scura munita di tappo di gomma.

6.2 Soluzione di solfato di manganese (364 g/L)

Sciogliere 364 g di solfato di manganese (II) monoidrato ($MnSO_4 \cdot H_2O$) in acqua; filtrare, se necessario, e diluire a 1000 mL.

6.3 Soluzione di fluoruro di potassio (400 g/L)

Sciogliere 40 g di fluoruro di potassio diidrato ($KF \cdot 2H_2O$) in acqua e diluire a 100 mL.

6.4 Soluzione di riferimento di tiosolfato sodico (0,1 N)

Si consiglia l'utilizzo di soluzioni 0,1 N disponibili in commercio.
In alternativa, sciogliere, in un matraccio tarato da 1 L, 25 g di tiosolfato sodico ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) in circa 800 mL di acqua deionizzata. Aggiungere come stabilizzante 1 g di carbonato sodico (Na_2CO_3) oppure 4 g di tetraborato sodico ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$). Portare a 1 L con acqua. Il controllo del titolo della soluzione di tiosolfato viene eseguito con soluzioni 0,1 N di KIO_3 o $KH(IO_3)_2$ disponibili in commercio o preparate sciogliendo 3,5670 g di KIO_3 o 3,2500 g di $KH(IO_3)_2$ in acqua e diluendo ad 1 L.
In una beuta con tappo a smeriglio sciogliere 2 g di KI esente da iodio in circa 100 mL di acqua. Aggiungere 7 mL di HCl concentrato e trasferire nella beuta 25-30 mL di soluzione di iodato o di idrogenoiodato di potassio precedentemente preparata. Titolare immediatamente con la soluzione di tiosolfato usando salda d'amido come indicatore, secondo le modalità indicate nel seguente Capitolo 7. Noti il volume e la normalità della soluzione di riferimento e il volume di tiosolfato consumato nella titolazione ricavare la normalità della soluzione di tiosolfato.

6.5 Soluzione di riferimento di tiosolfato sodico (0,0125 N)

Diluire 125 mL della soluzione (6.4) a 1000 mL con acqua. 1 mL di soluzione 0,0125 N corrisponde a 0,1 mg di ossigeno. La soluzione deve essere preparata al momento dell'uso.

6.6 Salda d'amido

Porre in un mortaio 5-6 g di amido e alcuni millilitri di acqua fredda. Macinare la pasta risultante, che viene poi versata in 1000 mL di acqua bollente. Far bollire per pochi minuti e lasciar depositare una notte. Utilizzare il liquido sovrastante. La soluzione può essere stabilizzata aggiungendo, per ogni litro, circa 1 g di acido salicilico o qualche goccia di toluene.

6.7 Acido solforico concentrato (d=1,84)

7. Procedimento

Aerare il campione in esame a saturazione per circa 10 minuti e lasciarlo riposare per 10 minuti, mantenendo la temperatura del campione a circa 20°C. In questo modo si può evitare la sovrasaturazione del campione. Trasferire il campione per sifonamento, evitando la formazione di bolle, in almeno due bottiglie da 300 mL (5.1). Riempire le bottiglie sino a circa 1 cm oltre l'inizio del cono a smeriglio.
Utilizzare almeno una delle bottiglie per il dosaggio del contenuto di ossigeno al tempo 0 secondo le modalità descritte al Paragrafo (7.1); porre l'altra (o le altre) in termostato a 20°C per 5 giorni, in completa oscurità per prevenire la produzione di ossigeno da parte delle alghe.
Al termine del periodo d'incubazione determinare l'ossigeno disciolto residuo secondo le modalità indicate al Paragrafo (7.1).

7.1 Determinazione dell'ossigeno disciolto

Aggiungere al campione contenuto nella bottiglia con tappo a smeriglio, 2 mL di soluzione di solfato di manganese (6.2) e 2 mL di soluzione alcalina di ioduro-sodio azide (6.1), avendo cura di introdurre le soluzioni sotto la superficie del liquido.
Chiudere la bottiglia eliminando le bolle d'aria e agitare capovolgendo molte volte la bottiglia; ripetete l'agitazione una seconda volta dopo che il precipitato si è depositato lasciando il liquido sovrastante limpido.
Quando il precipitato si è nuovamente depositato lasciando almeno 100 mL di liquido limpido, aprire la bottiglia e aggiungere 2 mL di H_2SO_4 concentrato (6.7), avendo cura di farlo fluire lungo il collo della bottiglia.
Se il campione contiene ferro (III), aggiungere, prima di acidificare, 1 mL di soluzione di fluoruro di potassio (6.3). Tappare nuovamente la bottiglia ed effettuare il mescolamento capovolgendo varie volte la bottiglia finchè lo iodio non è uniformemente distribuito. Far decantare la soluzione e titolarne subito 100 mL con la soluzione di tiosolfato (6.5), fino a un colore giallo paglierino. Aggiungere la salda d'amido e continuare a titolare fino a scomparsa del colore azzurro.

8 Calcoli

La concentrazione di ossigeno disciolto è dato da:

$$C = \frac{a \cdot N \cdot f \cdot 8 \cdot 1000}{V}$$

dove:
C = concentrazione (mg/L) di ossigeno disciolto;
a = volume (mL) di soluzione di tiosolfato di sodio utilizzato nella titolazione;
N = normalità della soluzione di tiosolfato di sodio;
8 = peso equivalente dell'ossigeno;
V = volume (mL) di campione utilizzato per la titolazione;
f = fattore di correzione per il volume dei reagenti introdotti nella bottiglia d'incubazione.

Il fattore di correzione (f) è dato da:

$$f = \frac{B}{B - b}$$

dove:
B = volume (mL) della bottiglia adoperata
b = volume totale (mL) dei reattivi impiegati per la precipitazione.

Se X e Y sono le concentrazioni di ossigeno disciolto nel campione, rispettivamente prima e dopo l'incubazione del campione stesso, il valore di BOD_5 (espresso come mg O_2/L) si ricava dalla seguente espressione:

$$BOD_5 = (X - Y)$$

9. Qualità del dato

Per valutare la precisione del metodo è necessario impiegare una soluzione di riferimento di glucosio e acido glutammico (*), preparata secondo le modalità indicate alla nota del Capitolo 9 del Metodo B1.

(*) Il consumo è opportuno che corrisponda al 40-70% dell'ossigeno disciolto presente prima dell'incubazione.

Lo scarto tipo (riproducibilità), ottenuta valutando i risultati di misura di 3 laboratori su 3 campioni ciascuno, per una concentrazione di circa 200 mg/L è di ±30 mg/L. Ripetizioni delle misure nello stesso laboratorio indicano uno scarto tipo pari a ±10 mg/L.

METODI B - Determinazione mediante diluizione

METODO B1 - Determinazione mediante diluizione, senza inoculo

1. Principio del metodo

Il metodo si basa sulla determinazione dell'ossigeno disciolto nel campione da analizzare, opportunamente diluito, prima e dopo una incubazione, al buio e alla temperatura di 20°C, di 5 giorni. La differenza tra le due determinazioni, moltiplicata per il fattore di diluizione, dà il valore del BOD_5 del campione in esame, espresso in mg/L di ossigeno.

2. Campo di applicazione

Il metodo trova applicazione nella misura del BOD_5 in acque naturali o di scarico, purchè non siano presenti sostanze inibitrici, i valori di pH siano compresi tra 6,3 e 8,5 e sia garantita la presenza di un idoneo consorzio batterico. Mentre per misurare valori di BOD_5 inferiori a 5 mg/L il campione viene analizzato tal quale (Metodo A), nel caso, invece, di valori del BOD_5 superiori a 5 mg/L è necessario ricorrere ad una adeguata diluizione. La diluizione deve essere stabilita in relazione al BOD_5 presunto del campione. Così ad esempio, se il valore presunto è compreso tra 5 mg/L e 12 mg/L, è opportuno diluire un volume del campione con un ugual volume di acqua di diluizione (6.8); se esso è compreso fra 12 mg/L e 25 mg/L, un volume del campione è diluito con quattro volumi dell'acqua di diluizione (6.8). Per valori superiori di BOD_5 è necessario effettuare diluizioni tali da ottenere un campione che, dopo il periodo di incubazione, presenti una quantità residua di ossigeno in grado di essere rilevata analiticamente (*). La diluizione deve essere eseguita con acqua di diluizione (6.8) preparata di fresco e satura d'ossigeno a 20°C.

3. Interferenze e cause d'errore

Interferiscono positivamente tutte quelle sostanze che vengono ossidate chimicamente dall'ossigeno disciolto. L'interferenza può comunque essere valutata in termini numerici a condizione che la reazione di ossidazione venga supposta completa.
Ad esempio nel caso di nitriti, ferro (II), solfuri e solfiti, che vengono rispettivamente ossidati a nitrati, ferro (III), zolfo e solfati, l'interferenza risulta pari a:

- 1 mg di nitriti (come azoto) = 1,14 mg di ossigeno;
- 1 mg di ossido di ferro (II) = 0,12 mg di ossigeno;
- 1 mg di idrogeno solforato = 0,47 mg di ossigeno;
- 1 mg di acido solforoso = 0,20 mg di ossigeno.

Interferiscono negativamente tutte le sostanze che, se presenti a una data concentrazione, esercitano un'azione inibente sull'attività dei microrganismi, rallentando o bloccando i processi ossidativi. In questi casi può accadere che tali errori siano evitati quando nei campioni in esame, con la diluizione necessaria per la esecuzione della misura del BOD_5, la con-

(*) Il consumo è opportuno che corrisponda al 40-70% dell'ossigeno disciolto presente prima dell'incubazione.

centrazione delle sostanze inibenti risulti riportata al di sotto della soglia d'interferenza. Le interferenze negative possono essere superate mediante trattamento del campione. Ad esempio il pH del campione può essere corretto mediante aggiunta di acido solforico o idrossido di sodio (entrambi circa 1 M), mentre per quanto concerne il cloro presente in campioni provenienti da trattamenti di clorazione è necessario un trattamento con solfito di sodio.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il prelievo e la conservazione del campione debbono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".
Si raccomanda di effettuare la determinazione del BOD_5 entro il minor tempo possibile dal prelievo del campione, onde evitare di ottenere valori in difetto conseguenti all'attività batterica. Ove ciò non sia possibile, occorre conservare il campione a 3-4°C per un periodo non superiore a 24 ore.

5. Apparecchiature

Attrezzatura di uso comune in laboratorio, e:

5.1 Bottiglie di incubazione, della capacità di 300 mL (±1,5 mL), fornite di tappo a smeriglio a tenuta, numerate sul corpo e sul tappo e dotate di idonea svasatura per garantire la tenuta idraulica. Il volume di ciascuna bottiglia nel caso in cui non si disponga di bottiglie tarate deve essere determinato a 20°C e annotato.

5.2 Termostato, da usare a 20°C, regolabile a ±1°C.

5.3 Compressore o bombola di aria compressa

Purificare l'aria per passaggio attraverso una bottiglia di lavaggio contenente acqua o ricorrendo ad altri dispositivi atti ad eliminare eventuali impurezze.

5.4 Setto poroso per l'aerazione

6. Reattivi

Utilizzare soltanto acqua distillata o deionizzata e reagenti di grado analitico.

6.1 Soluzione alcalina di ioduro di potassio e sodio azide

Sciogliere rapidamente 500 g di idrossido di sodio (NaOH) posti in una beuta da 1000 mL munita di tappo di gomma in 250 mL di acqua, raffreddare a temperatura ambiente, aggiungere 150 g di ioduro di potassio (KI) e diluire a circa 800 mL. Aggiungere lentamente alla soluzione fredda, sotto continua agitazione, 10 g di sodio azide (NaN_3), previamente disciolti in 40 mL di acqua. Travasare quantitativamente in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua.
Conservare in bottiglia scura munita di tappo di gomma.

6.2 Soluzione di solfato di manganese (364 g/L)

Sciogliere 364 g di solfato di manganese (II) monoidrato ($MnSO_4 \cdot H_2O$) in acqua; filtrare, se necessario, e diluire a 1000 mL.

6.3 Soluzione di fluoruro di potassio (400 g/L)

Sciogliere 40 g di fluoruro di potassio diidrato ($KF \cdot 2H_2O$) in acqua e diluire a 100 mL.

6.4 Soluzione di riferimento di tiosolfato sodico (0,1 N)

Si consiglia l'utilizzo di soluzioni 0,1 N disponibili in commercio.
In alternativa, sciogliere, in un matraccio tarato da 1 L, 25 g di tiosolfato sodico ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) in circa 800 mL di acqua deionizzata. Aggiungere come stabilizzante 1 g di carbonato sodico (Na_2CO_3) oppure 4 g di tetraborato sodico ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$). Portare a 1 L con acqua. Il controllo del titolo della soluzione di tiosolfato viene eseguito con soluzioni 0,1 N di KIO_3 o $KH(IO_3)_2$ disponibili in commercio o preparate sciogliendo 3,5670 g di KIO_3 o 3,2500 g di $KH(IO_3)_2$ in acqua e diluendo ad 1 L.
In una beuta con tappo a smeriglio sciogliere 2 g di KI esente da iodio in circa 100 mL di acqua. Aggiungere 7 mL di HCl concentrato e trasferire nella beuta 25-30 mL di soluzione di iodato o di idrogenoiodato di potassio precedentemente preparato. Titolare immediatamente con la soluzione di tiosolfato usando salda d'amido come indicatore, secondo le modalità indicate al Capitolo 7. Noti il volume e la normalità della soluzione di riferimento e il volume di tiosolfato consumato nella titolazione ricavare la normalità della soluzione di tiosolfato.

6.5 Soluzione di riferimento di tiosolfato sodico (0,0125 N)

Diluire 125 mL della soluzione (6.4) a 1000 mL con acqua. 1 mL di soluzione 0,0125 N corrisponde a 0,1 mg di ossigeno. La soluzione deve essere preparata al momento dell'uso.

6.6 Salda d'amido

Porre in un mortaio 5-6 g di amido e alcuni mL di acqua fredda. Macinare la pasta risultante, che viene poi versata in 1000 mL di acqua bollente. Far bollire per pochi minuti e lasciar depositare una notte. Utilizzare il liquido sovrastante. La soluzione può essere stabilizzata aggiungendo, per ogni litro, circa 1 g di acido salicilico o qualche goccia di toluene.

6.7 Acido solforico concentrato (d=1,84)

6.8 Acqua di diluizione

La preparazione viene effettuata aggiungendo 1 mL di ciascuna delle seguenti soluzioni (*) a un litro d'acqua:

- soluzione di $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ a 0,25 g/L
- soluzione di $CaCl_2$ anidro a 27,5 g/L
- soluzione di $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ a 22,5 g/L
- soluzione tampone a pH 7,2.

La soluzione tampone a pH 7,2 viene preparata sciogliendo 21,75 g di K_2HPO_4; 8,5 g di KH_2PO_4; 33,4 g di $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ e 1,7 g di NH_4Cl, in un litro d'acqua.
Aerare la soluzione a saturazione per 15 minuti e lasciare a riposo per almeno altri 15 minuti. L'acqua di diluizione è stabile al massimo per una settimana. Trascorso detto tempo deve essere ripreparata avendo cura di lavare bene i contenitori con miscela cromica, risciacquando con acqua.

(*) Nella determinazione del BOD_5, se si vuole escludere il contributo dei processi di nitrificazione, che generalmente si instaurano dopo che è stata soddisfatta la richiesta da parte delle sostanze carboniose, occorre aggiungere un agente chimico inibente. Per esempio, 1 mL di una soluzione contenente 0,5 g/L di alliltiourea in acqua oltre alle soluzioni indicate.

7. Procedimento

Qualora il campione in esame presenti delle sostanze che interferiscono nella misura del BOD_5, bisogna sottoporlo ad opportuni trattamenti, secondo quanto descritto al Capitolo 3.
Stabilire la diluizione o le diluizioni più opportune, introdurre cautamente acqua di diluizione (6.8), aerata a saturazione, per sifonamento o per caduta da una bottiglia di Mariotte, assicurandosi che non si abbiano forti rimescolamenti e conseguenti variazioni del contenuto d'ossigeno.
Riempire le bottiglie sino a circa 1 cm al di sopra della linea che segna l'inizio del cono a smeriglio. Utilizzare almeno una delle bottiglie per il dosaggio del contenuto di ossigeno al tempo 0 secondo le modalità descritte al Paragrafo (7.1) del Metodo A; porre l'altra (o le altre) in termostato a 20°C per 5 giorni, in completa oscurità per prevenire la produzione di ossigeno da parte delle alghe.
Contemporaneamente travasare un campione d'acqua di diluizione (6.8), aerata a saturazione, con le stesse modalità in almeno due bottiglie: utilizzarne una per la determinazione del contenuto al tempo zero dell'ossigeno disciolto e l'altra per l'incubazione. Al termine del periodo d'incubazione determinare, sia nel campione in esame sia nell'acqua di diluizione, l'ossigeno disciolto residuo, secondo il procedimento descritto al Metodo A (7.1).

8. Calcoli

Calcolare il BOD_5 tramite la formula seguente:

$$C_{BOD_5} = (X - Y)\frac{V}{v} - (C - E)\frac{V - v}{v}$$

dove:
C_{BOD_5} = Domanda biochimica di ossigeno (mg O_2/L);
X = ossigeno disciolto (mg/L) nel campione diluito prima della incubazione;
Y = ossigeno disciolto (mg/L) nel campione diluito dopo l'incubazione;
V = volume (mL) della bottiglia di incubazione;
v = volume (mL) del campione preso in esame;
C = ossigeno disciolto (mg/L) nell'acqua di diluizione prima dell'incubazione;
E = ossigeno disciolto (mg/L) nell'acqua di diluizione dopo l'incubazione.

9. Qualità del dato

Per valutare la precisione del metodo è necessario impiegare una soluzione di riferimento di glucosio e acido glutammico(*).
Lo scarto tipo (riproducibilità) ottenuta valutando i risultati di misura di 3 laboratori su 3 campioni ciascuna, per una concentrazione di circa 200 mg/L è di ±30 mg/L. Ripetizioni delle misure nello stesso laboratorio indicano uno scarto tipo pari a ±10 mg/L.

(*) Generalmente questa soluzione di riferimento si prepara sciogliendo in acqua distillata 150 mg di glucosio e 150 mg di acido glutammico, previamente essiccati entrambi per un'ora a 105°C, e portando a 1000 mL con acqua distillata.
Prelevare aliquote di 5,0 mL di questa soluzione, portare a volume la bottiglia da BOD con acqua di diluizione inoculata e procedere alla determinazione del BOD della soluzione di riferimento.
Questa soluzione corrisponde ad un valore di BOD_5 pari a 218±11 mg/L.

METODO B2 - Determinazione mediante diluizione, con inoculo

1. Principio del metodo

Il metodo si basa sulla determinazione dell'ossigeno disciolto nel campione da analizzare, opportunamente diluito e inoculato, prima e dopo una incubazione di 5 giorni al buio e alla temperatura di 20°C.
La differenza tra le due determinazioni, moltiplicata per il fattore di diluizione, dà il valore del BOD_5 del campione in esame espresso in mg/L di ossigeno.

2. Campo di applicazione

Questo metodo per la determinazione del BOD_5 può essere applicato in acque sterili o che contengono sostanze inibenti l'attività batterica, o che richiedano particolari inoculi.

3. Interferenze e cause d'errore

Interferiscono positivamente tutte quelle sostanze che vengono ossidate chimicamente dall'ossigeno disciolto. L'interferenza può comunque essere valutata in termini numerici a condizione che la reazione di ossidazione venga supposta completa.
Ad esempio nel caso di nitriti, ferro (II), solfuri e solfiti, che vengono rispettivamente ossidati a nitrati, ferro (III), zolfo e solfati, l'interferenza risulta pari a:

- 1 mg di nitriti (come azoto) = 1,14 mg di ossigeno;
- 1 mg di ossido di ferro (II) = 0,12 mg di ossigeno;
- 1 mg di idrogeno solforato = 0,47 mg di ossigeno;
- 1 mg di acido solforoso = 0,20 mg di ossigeno.

Interferiscono negativamente tutte le sostanze che, se presenti a una data concentrazione, esercitano un'azione inibente sull'attività dei microrganismi, rallentando o bloccando i processi ossidativi. In questi casi può accadere che tali errori siano evitati quando nei campioni in esame, con la diluizione necessaria per la esecuzione della misura del BOD_5, la concentrazione delle sostanze inibenti risulti riportata al di sotto della soglia d'interferenza.
Le interferenze negative possono essere superate mediante trattamento del campione. Ad esempio il pH del campione può essere corretto mediante aggiunta di acido solforico o idrossido di sodio (entrambi circa 1 M), mentre per quanto concerne il cloro presente in campioni provenienti da trattamenti di clorazione è necessario un trattamento con solfito di sodio.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il prelievo e la conservazione del campione debbono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".
Si raccomanda di effettuare la determinazione del BOD_5 entro il minor tempo possibile dal prelievo del campione, onde evitare di ottenere valori in difetto conseguenti all'attività batterica. Ove ciò non sia possibile, occorre conservare il campione a 3-4°C per un periodo non superiore a 24 ore.

5. Apparecchiature

Attrezzatura di uso comune in laboratorio, e:

5.1 *Bottiglie di incubazione*, della capacità di 300 mL (±1,5 mL), fornite di tappo a sme-

riglio a tenuta, numerate sul corpo e sul tappo e dotate di idonea svasatura per garantire la tenuta idraulica. Il volume di ciascuna bottiglia nel caso in cui non si disponga di bottiglie tarate deve essere determinato a 20°C e annotato.

5.2 Termostato, da usare a 20°C, regolabile a ±1°C.

5.3 Compressore o bombola di aria compressa

Purificare l'aria per passaggio attraverso una bottiglia di lavaggio contenente acqua o ricorrendo ad altri dispositivi atti ad eliminare eventuali impurezze.

5.4 Setto poroso per l'aerazione

6. Reattivi

Utilizzare soltanto acqua distillata o deionizzata e reagenti di grado analitico.

6.1 Soluzione alcalina di ioduro di potassio e sodio azide

Sciogliere rapidamente 500 g di idrossido di sodio (NaOH) posti in una beuta da 1000 mL munita di tappo di gomma in 250 mL di acqua, raffreddare a temperatura ambiente, aggiungere 150 g di ioduro di potassio (KI) e diluire a circa 800 mL. Aggiungere lentamente alla soluzione fredda, sotto continua agitazione, 10 g di sodio azide (NaN_3), previamente disciolti in 40 mL di acqua. Travasare quantitativamente in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua.
Conservare in bottiglia scura munita di tappo di gomma.

6.2 Soluzione di solfato di manganese (364 g/L)

Sciogliere 364 g di solfato di manganese (II) monoidrato ($MnSO_4 \cdot H_2O$) in acqua; filtrare, se necessario, e diluire a 1000 mL.

6.3 Soluzione di fluoruro di potassio (400 g/L)

Sciogliere 40 g di fluoruro di potassio diidrato ($KF \cdot 2H_2O$) in acqua e diluire a 100 mL.

6.4 Soluzione di riferimento di tiosolfato sodico (0,1 N)

Si consiglia l'utilizzo di soluzioni 0,1 N disponibili in commercio.
In alternativa, sciogliere, in un matraccio tarato da 1 L, 25 g di tiosolfato sodico ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$) in circa 800 mL di acqua deionizzata. Aggiungere come stabilizzante 1 g di carbonato sodico (Na_2CO_3) oppure 4 g di tetraborato sodico ($Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$). Portare a 1 L con acqua. Il controllo del titolo della soluzione di tiosolfato viene eseguito con soluzioni 0,1 N di KIO_3 o $KH(IO_3)_2$ disponibili in commercio o preparate sciogliendo 3,5670 g di KIO_3 o 3,2500 g di $KH(IO_3)_2$ in acqua e diluendo ad 1 L.
In una beuta con tappo a smeriglio sciogliere 2 g di KI esente da iodio in circa 100 mL di acqua. Aggiungere 7 mL di HCl concentrato e trasferire nella beuta 25-30 mL di soluzione di iodato o di idrogenoiodato di potassio precedentemente preparato. Titolare immediatamente con la soluzione di tiosolfato usando salda d'amido come indicatore, secondo le modalità indicate al Capitolo 7. Noti il volume e la normalità della soluzione di riferimento e il volume di tiosolfato consumato nella titolazione ricavare la normalità della soluzione di tiosolfato.

6.5 Soluzione di riferimento di tiosolfato sodico (0,0125 N)

Diluire 125 mL della soluzione (6.4) a 1000 mL con acqua. 1 mL di soluzione 0,0125 N corrisponde a 0,1 mg di ossigeno. La soluzione deve essere preparata al momento dell'uso.

6.6 Salda d'amido

Porre in un mortaio 5-6 g di amido e alcuni mL di acqua fredda. Macinare la pasta risultante, che viene poi versata in 1000 mL di acqua bollente. Far bollire per pochi minuti e lasciar depositare una notte. Utilizzare il liquido sovrastante. La soluzione può essere stabilizzata aggiungendo, per ogni litro, circa 1 g di acido salicilico o qualche goccia di toluene.

6.7 Acido solforico concentrato (d=1,84)

6.8 Acqua di diluizione

La preparazione viene effettuata aggiungendo 1 mL di ciascuna delle seguenti soluzioni (*) a un litro d'acqua:

- soluzione di $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ a 0,25 g/L;
- soluzione di $CaCl_2$ anidro a 27,5 g/L;
- soluzione di $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ a 22,5 g/L;
- soluzione tampone a pH 7,2.

La soluzione tampone a pH 7,2 viene preparata sciogliendo 21,75 g di K_2HPO_4; 8,5 g di KH_2PO_4; 33,4 g di $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ e 1,7 g di NH_4Cl, in un litro d'acqua.
Aerare la soluzione a saturazione per 15 minuti e lasciare a riposo per almeno altri 15 minuti. L'acqua di diluizione è stabile al massimo per una settimana. Trascorso detto tempo deve essere ripreparata avendo cura di lavare bene i contenitori con miscela cromica, risciacquando con acqua.

7. Procedimento

7.1 Scelta e preparazione dell'inoculo

La scelta di un appropriato inoculo è un fattore molto importante nella determinazione del BOD_5. In molti casi un inoculo soddisfacente è rappresentato dal liquido supernatante proveniente dal liquame di fogna, sedimentato e conservato in incubazione e agitato per 24 ore alla temperatura di 20°C.
Molti scarichi industriali contengono però sostanze organiche non degradabili dai consorzi microbici derivati dal liquame di fogna. In questi casi, utilizzare come inoculo l'effluente dell'impianto di depurazione asservito o il supernatante di un fango attivo prelevato presso altro impianto. Qualora i suddetti inoculi non siano disponibili, utilizzare un inoculo sviluppato in laboratorio oppure l'acqua del corpo idrico ricevente raccolta preferibilmente a 500-2000 metri a valle dal punto d'immissione degli scarichi da esaminare.
L'acqua, impiegata come inoculo, potrà fornire i migliori risultati se verrà prelevata in punti in cui si siano sviluppati particolari microrganismi capaci di utilizzare come alimento i composti organici presenti (consorzi microbici adesi a superfici sommerse). Talvolta può essere necessario concentrare l'inoculo mediante centrifugazione a 7000 giri/min per 30 minuti oppure per filtrazione (0,45 μm).

(*) Nella determinazione del BOD_5, se si vuole escludere il contributo dei processi di nitrificazione, che generalmente si instaurano dopo che è stata soddisfatta la richiesta da parte delle sostanze carboniose, occorre aggiungere un agente chimico inibente. Per esempio, 1 mL di una soluzione di contenente 0,5 g/L di alliltiourea in acqua oltre alle soluzioni indicate.

E opportuno ricordare che l'inoculo dev'essere effettuato sui campioni trattati, qualora fosse stata necessaria la correzione del pH o l'eliminazione di talune sostanze tossiche.
È possibile utilizzare come inoculo anche i microrganismi presenti nel terreno. Sospendere 100 g di terra da giardino in 1000 mL di acqua di rubinetto non clorata. Può essere utile lo stemperamento preventivo della terra in mortaio. Evitare terre troppo ricche in argilla e non prelevare campioni di terra dopo piogge prolungate. Agitare vigorosamente la sospensione, possibilmente con l'aiuto di un agitatore meccanico. Lasciar decantare per 30 minuti, raccogliere 4 litri di liquido supernatante e filtrarli su carta da filtro rapida. Eliminare i primi 200 mL e tenere i restanti in aerazione fino al momento dell'uso. L'inoculo così preparato deve essere impiegato nel giorno stesso in cui è stato preparato.

7.2 Acclimatazione

Talvolta i consorzi batterici utilizzati non sono idonei a metabolizzare alcune sostanze organiche difficilmente biodegradabili contenute in alcuni scarichi. Questo inconveniente, in taluni casi, può essere eliminato mediante un processo di acclimatazione in laboratorio.
L'acclimatazione determina la selezione e l'arricchimento del consorzio batterico, con vantaggi generici, quali, ad esempio, il superamento di inibizioni dovute a sostanze tossiche o alla composizione del campione stesso.
L'acclimatazione può essere realizzata aerando e alimentando gli arricchimenti microbici con piccole dosi giornaliere di scarichi in esame fino a quando non si sia sviluppato un consorzio microbico adatto a metabolizzare le sostanze organiche presenti.
Le modalità usualmente impiegate per la realizzazione di un processo di acclimatazione, ad esempio, di un liquame di fogna sono le seguenti:

- prelevare un campione di 4 o 5 litri, lasciar sedimentare e sottoporre a un processo di moderata aerazione per circa 24 ore;
- sospendere l'aerazione e lasciar sedimentare per 30 minuti;
- sifonare parte del liquido supernatante, sostituendolo con un'aliquota delle acque di scarico in esame da acclimatare e riportare al volume iniziale con il liquame di fogna previamente sedimentato;
- ripetere l'aerazione per altre 24 ore e lasciar poi sedimentare per 30 minuti;
- sostituire la fase supernatante con un'altra aliquota d'acqua in esame;
- ripetere le operazioni di sedimentazione ed immissione del campione con le stesse modalità aumentando gradatamente l'aliquota dell'acqua da acclimatare fino a raggiungere il 100%. A questo punto impiegare il campione con inoculo per il dosaggio del BOD_5.

7.3 Dosaggio

Effettuare le indagini preliminari per la determinazione della presenza o meno di interferenze (positive o negative) allo scopo di procedere agli opportuni pretrattamenti necessari alla loro eliminazione o riduzione, secondo le modalità prescritte nel Metodo B1. Quindi, stabilito il rapporto di diluizione più opportuno, diluire il campione in esame con acqua di diluizione (6.8) contenente l'inoculo comunque ottenuto.
Aggiungere l'inoculo orientativamente in ragione di 2 mL/L di acqua di diluizione nel caso si utilizzi liquame di fogna sedimentato, e di 20 mL/L di acqua di diluizione se si impiega acqua del corpo idrico ricevente.
Quindi procedere alla determinazione del BOD_5 applicando le stesse modalità tecniche descritte al Metodo B1 tenendo presente che è necessario porre in incubazione anche l'acqua di diluizione contenente l'inoculo semplice o acclimatato al fine di determinare il BOD_5.

8. Calcoli

Calcolare BOD_5 tramite la formula seguente:

$$C_{BOD_5} = (X - Y)\frac{V}{v} - (C - E)\frac{V - v}{v}$$

dove:
C_{BOD_5} = Domanda biochimica di ossigeno (mg O_2/L);
X = ossigeno disciolto (mg/L) nel campione diluito prima della incubazione;
Y = ossigeno disciolto (mg/L) nel campione diluito dopo l'incubazione;
V = volume (mL) della bottiglia di incubazione;
v = volume (mL) del campione preso in esame;
C = ossigeno disciolto (mg/L) nell'acqua di diluizione prima dell'incubazione;
E = ossigeno disciolto (mg/L) nell'acqua di diluizione dopo l'incubazione.

9. Qualità del dato

Per valutare la precisione del metodo è necessario impiegare una soluzione di riferimento di glucosio e acido glutammico (*).
Lo scarto tipo (riproducibilità) ottenuto valutando i risultati di misura di 3 laboratori su 3 campioni ciascuna, per una concentrazione di circa 200 mg/L è di ±30 mg/L. Ripetizioni delle misure nello stesso laboratorio indicano uno scarto tipo pari a ±10 mg/L.

APPENDICE

La misura del BOD può essere utilizzata anche per studiare la biodegradabilità delle sostanze contenute in un determinato campione. A tal fine si segue l'andamento del BOD attraverso misure effettuate da 1 a 20 giorni d'incubazione (BOD_1, BOD_2.....BOD_{20}) e si riportano poi i valori in diagramma, ponendo sulle ascisse i tempi di incubazione e sulle ordinate i corrispondenti valori del BOD. I valori giornalieri di BOD risulteranno più elevati, per ogni successivo giorno d'incubazione, e la differenza tra i valori di BOD riscontrati, per ciascun giorno d'incubazione successiva, diminuirà proporzionalmente, almeno per i primi cinque giorni. Dopo i cinque giorni, nel caso in cui subentrino processi di nitrificazione, potrà riscontrarsi anche un aumento.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed. (Washington, APHA).

IRSA (1986): "Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **75**, 141-142.

MARCHETTI R. (1966): "Determinazione del BOD in indagini sul torrente Seveso", Nota n. 12, *Acqua Industriale,* **43,** 23-25.

(*) Generalmente questa soluzione di riferimento si prepara sciogliendo in acqua distillata 150 mg di glucosio e 150 mg di acido glutammico, previamente essiccati entrambi per un'ora a 105°C, e portando a 1000 mL con acqua distillata.
Prelevare aliquote di 5,0 mL di questa soluzione, portare a volume la bottiglia da BOD con acqua di diluizione inoculata e procedere alla determinazione del BOD della soluzione di riferimento.
Questa soluzione corrisponde ad un valore di BOD_5 pari a 218±11 mg/L.

5130. Richiesta chimica di ossigeno (COD)

Il COD rappresenta la misura dell'ossigeno necessario ad ossidare chimicamente le sostanze presenti in un campione, per mezzo di un ossidante forte in ambiente acido a caldo.
Il COD viene preferito al BOD, per il minor tempo richiesto dall'analisi, nel controllo di routine di liquami grezzi e depurati, soprattutto industriali, una volta che sia stato quantificato su base statistica il rapporto COD/BOD. Tale rapporto varia in funzione del tipo di sostanze scaricate: liquami da fognature prevalentemente civili hanno, ad esempio, un rapporto COD/BOD=1,9-2,5 e ciò vale anche per molti effluenti industriali provenienti da lavorazioni alimentari.
L'uso del COD per il controllo delle acque superficiali è molto più limitato, soprattutto per il fatto che, mentre il BOD simula in qualche modo i processi di degradazione che avvengono in natura, è estremamente difficile correlare il valore del COD con gli effetti deossigenanti nel recettore. L'uso del COD può essere consigliato in quei casi in cui si sospettano sversamenti tossici per i consorzi microbici e che deprimono, totalmente o in parte, il valore del BOD.

1. Principio del metodo

Viene proposto un metodo generale applicabile a campioni acquosi contenenti concentrazioni di cloruri ≤1000 mg/L e procedure modificate per rendere il metodo applicabile a campioni con più di 1000 mg/L di cloruri.
Il metodo prevede l'ossidazione delle sostanze organiche ed inorganiche, presenti in un campione d'acqua, mediante una soluzione di dicromato di potassio in presenza di acido solforico concentrato e di solfato di argento, come catalizzatore dell'ossidazione. L'eccesso di dicromato viene titolato con una soluzione di solfato di ammonio e ferro (II).
La concentrazione delle sostanze organiche ed inorganiche ossidabili, nelle condizioni del metodo, è proporzionale alla quantità di dicromato di potassio consumato. Lo ione cloruro è considerato un interferente, poichè la sua ossidazione può avvenire solo nelle condizioni del metodo utilizzato per il COD e non in quelle presenti nelle acque naturali.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ad acque naturali e di scarico (urbane ed industriali) aventi una concentrazione di cloruri ≤1000 mg/L. Per concentrazioni di COD>50 mg/L si consiglia l'utilizzo di una soluzione di dicromato 0,25 N. In questi casi, qualora la concentrazione di cloruri risulti >1000 mg/L nel campione sottoposto ad analisi e ogni qualvolta il rapporto in peso COD/cloruri nel campione di analisi sia <0,1, è richiesto il ricorso alle procedure modificate nel seguito descritte.
Per concentrazioni di COD<50 mg/L si consiglia il ricorso ad una soluzione di dicromato 0,025 N.

3. Interferenze e cause di errore

Non tutte le sostanze organiche nelle condizioni del metodo vengono ossidate in maniera completa dal dicromato di potassio (ad esempio acido acetico e composti alifatici a catena lineare).

L'impiego del solfato di argento, come catalizzatore, consente di rendere più alta la resa della reazione di ossidazione. Anche in queste condizioni alcuni composti (benzene, toluene, xileni, naftalene, antracene, ecc.) vengono ossidati solo parzialmente mentre altri (piridina, ecc.) non subiscono ossidazione. Un errore in difetto nella determinazione del COD potrebbe essere causato dalla volatilizzazione di alcune sostanze organiche. Tali perdite possono essere comunque ridotte.
I cloruri interferiscono positivamente in quanto vengono ossidati dal dicromato (1 mg di Cl^- corrisponde a 0,226 mg di COD). Tale interferenza, a concentrazioni di cloruri inferiori a 1000 mg/L e comunque in presenza di un rapporto in peso COD/cloruro >0,1, viene praticamente eliminata addizionando solfato di mercurio (II) nel rapporto in peso $HgSO_4/Cl^-=10$.
Per concentrazioni di cloruri superiori a 1000 mg/L, qualora il rapporto in peso COD/cloruro sia minore di 0,1 è necessario fare ricorso alle procedure A (7.3.1) e B (7.3.2) nel seguito proposte, che consentono di ridurre il valore dell'interferenza residua e di valutare sperimentalmente termini correttivi appropriati da sottrarre al valore del COD.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere fatti in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".
In particolare se il campione non può essere analizzato subito dopo il prelievo, esso, al fine di evitare eventuali perdite conseguenti ad ossidazione biologica delle sostanze organiche, deve essere preservato per acidificazione fino a pH=1÷2 con acido solforico (6.6). In ogni caso è consigliabile effettuare l'analisi il più presto possibile.

5. Apparecchiature

5.1 Normale attrezzatura di laboratorio

5.2 Apparecchiatura in vetro per l'ebollizione a ricadere

Recipiente in vetro da 500 mL con collo di vetro smerigliato, connesso ad un condensatore a bolle (altezza minima 60 cm) per evitare perdite significative di prodotti volatili.
In alternativa, è possibile l'utilizzo di altri sistemi, disponibili in commercio, con sistema a ricadere munito di campanella, in cui il condensatore a bolle è sostituito da lunghe cannule di vetro. Questa differenza comporta un errore, dovuto alla perdita di sostanze volatili, che può rientrare nell'incertezza del metodo analitico.

5.3 Mantello riscaldante elettrico o analogo dispositivo in grado di portare il campione all'ebollizione.

5.4 Buretta da 25 mL con divisioni da 0,05 mL.

6. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere del tipo "puro per analisi".

6.1 Acqua

Per la preparazione delle soluzioni dei reattivi e per le diluizioni impiegare acqua distillata e/o deionizzata.

6.2 Solfato di mercurio (II) $HgSO_4$, in cristalli.

6.3 Solfato d'argento Ag_2SO_4, in cristalli.

6.4 Soluzione concentrata di dicromato di potassio (0,25 N)

Sciogliere 12,259 g di dicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$), previamente essiccato per 2 ore a 105°C, in acqua e diluire a 1000 mL in matraccio tarato.

6.5 Soluzione diluita di dicromato di potassio (0,025 N)

Diluire a 1000 mL, in matraccio tarato, 100 mL della soluzione di dicromato di potassio 0,25 N (6.4).

6.6 Acido solforico concentrato, H_2SO_4 (d=1,84)

6.7 Soluzione di 1,10-fenantrolina-solfato di ferro (II) (ferroina)

Sciogliere 1,485 g di 1,10-fenantrolina monoidrato, $C_{12}H_8N_2 \cdot H_2O$, in circa 80 mL di acqua. Aggiungere 0,695 g di solfato di ferro (II) eptaidrato, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$. Agitare sino a completa dissoluzione e diluire a 100 mL con acqua.

6.8 Soluzione concentrata di solfato d'ammonio e ferro (II) (0,25 N)

Sciogliere 98 g di solfato di ammonio e ferro (II) esaidrato, $FeSO_4(NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$, in 500 mL di acqua. Aggiungere 20 mL di acido solforico concentrato (6.6), raffreddare e diluire a 1000 mL.
Il controllo del titolo di questa soluzione viene effettuato con una soluzione di bicromato di potassio 0,25 N (6.4) impiegando come indicatore una soluzione di fenantrolina (6.7).

6.9 Soluzione diluita di solfato d'ammonio e ferro (II) (0,025 N)

Diluire a 1000 mL in matraccio tarato 100 mL della soluzione di solfato di ammonio e ferro (II) 0,25 N (6.8). Il controllo del titolo della soluzione viene effettuato con una soluzione di dicromato di potassio 0,025 N (6.5).

6.10 Idrogenoftalato di potassio $C_8H_5KO_4$, in cristalli.

1 g di idrogeno ftalato di potassio corrisponde a 1,176 g di COD.

7. Procedimento

7.1 Procedimento per acque con COD>50 mg/L

Porre in un recipiente di vetro da 500 mL un campione di 50 mL o, nel caso di COD>900 mg/L, una aliquota diluita a 50 mL con acqua (6.1). Aggiungere una quantità di solfato di mercurio (II) (6.2) sufficiente a bloccare i cloruri presenti (vedi Capitolo 3), 5 mL di H_2SO_4 concentrato (6.6) ed alcune sferette di vetro da ebollizione. L'acido solforico deve essere aggiunto lentamente ed agitando per avere la completa dissoluzione del solfato di mercurio (II). Il recipiente deve essere inoltre raffreddato onde evitare eventuali perdite di sostanze volatili. Addizionare quindi 50 mg di solfato di argento (6.3) e, agitando, 25 mL della soluzione 0,25 N di dicromato di potassio (6.4). Inserire il refrigerante ed iniziare la circolazione dell'acqua. Infine, lentamente ed agitando, versare 70 mL di acido solforico concentrato (6.6).
Iniziare il riscaldamento e lasciare bollire per 2 ore. Interrotto il riscaldamento, lasciare raffreddare, lavare bene il refrigerante con acqua in modo da diluire il contenuto del recipiente fino ad un volume di 350-400 mL. Aggiungere 2-3 gocce di soluzione indicatrice di fenantrolina (6.7) e titolare l'eccesso di dicromato con la soluzione di solfato di ammonio e fer-

ro (II) 0,25 N (6.8) fino a viraggio del colore da blu-verde a bruno-rosso. Eseguire in parallelo una prova in bianco sostituendo i 50 mL di campione con 50 mL di acqua (6.1).

7.2 Procedimento per acque con COD compreso fra 20 e 50 mg/L

Il procedimento è lo stesso del Paragrafo (7.1), con la sola variante dell'impiego delle soluzioni 0,025 N di dicromato di potassio (6.5) e 0,025 N di solfato di ammonio e ferro (II) (6.9) invece che le corrispondenti soluzioni 0,25 N (6.4 e 6.8).
Poichè potrebbe rivelarsi difficoltoso cogliere il viraggio di colore dell'indicatore, può essere utile determinare il punto finale per via potenziometrica.

7.3 Modifiche al metodo generale per campioni con cloruri>1000 mg/L e rapporti in peso COD/Cl^-<0,1

7.3.1 Procedura A

È applicabile nel campo di concentrazione di Cl^- 1000-6000 mg/L. Si differenzia rispetto al metodo generale per due modifiche, alternative l'una all'altra, consigliate per ridurre il valore dell'interferenza.

A1) L'uso di una soluzione di dicromato 0,15 N al posto della soluzione 0,25 N consigliata per COD>50 mg/L; ovviamente la soluzione 0,15 N copre un campo di applicazione di COD più ristretto (fino a 500 mg O_2/L) rispetto a quello consentito dalla soluzione 0,25 N (fino a 900 mg O_2/L).

A2) L'uso di un rapporto in peso $HgSO_4/Cl^-$ di 20:1, doppio rispetto a quello indicato nel metodo generale.

Utilizzando le modifiche indicate è stata valutata l'interferenza residua in soluzioni sintetiche contenenti concentrazioni note di idrogenoftalato di potassio, considerato come sostanza organica modello. I valori residui di interferenza ottenuti su campioni con concentrazioni di COD prossime al limite di legge (160 mg/L) e concentrazioni di Cl^- nell'intervallo 1000-6000 mg/L si aggirano sulle 10 unità di COD. Prove effettuate su altri composti organici hanno mostrato un effetto simile a quello dell'idrogenoftalato di potassio. Sebbene sia problematico estrapolare dalle prove sperimentali termini correttivi appropriati per condizioni estremamente eterogenee in termini di concentrazione di COD e Cl^- poichè l'interferenza prodotta dai cloruri è una funzione del rapporto COD/Cl^-, si ritiene che l'applicazione di un termine correttivo di 20 unità da sottrarre al valore ottenuto di COD possa rappresentare un'ampia garanzia nei riguardi dell'interferenza, qualora i valori di COD e Cl^- siano rispettivamente nell'intervallo 100-200 e 1000-6000 mg/L.

7.3.2 Procedura B

La procedura fa riferimento al lavoro di Baumann su scarichi ad elevata salinità e consiste nel far ricorso ad un apparato sperimentale del tipo schematizzato in Fig. 1 che consente il recupero e la determinazione del cloro gassoso sviluppatosi durante il procedimento di ossidazione alla base della misura del COD.
Tale procedura è stata verificata su campioni contenenti concentrazioni di COD e cloruri rispettivamente nei campi 100-200 e 2000-20000 mg/L. È raccomandata nel caso di concentrazioni di Cl^- >6000 mg/L; se ne sconsiglia l'uso per campioni a basso contenuto organico (COD<100 mg/L).
Il cloro gassoso, che si sviluppa, viene raccolto nel cilindro (c) contenente 200 mL di H_2O in cui sono disciolti 2,5 g di ioduro di potassio e 5 mL di acido acetico glaciale. Lo iodio prodotto a seguito dell'ossidazione dello ioduro da parte del cloro sviluppatosi viene retrotitolato con tiosolfato sodico 0,01 N utilizzando salda d'amido come indicatore, come riportato nel metodo per la determinazione del BOD_5 (metodo 5120), al quale si rimanda anche per

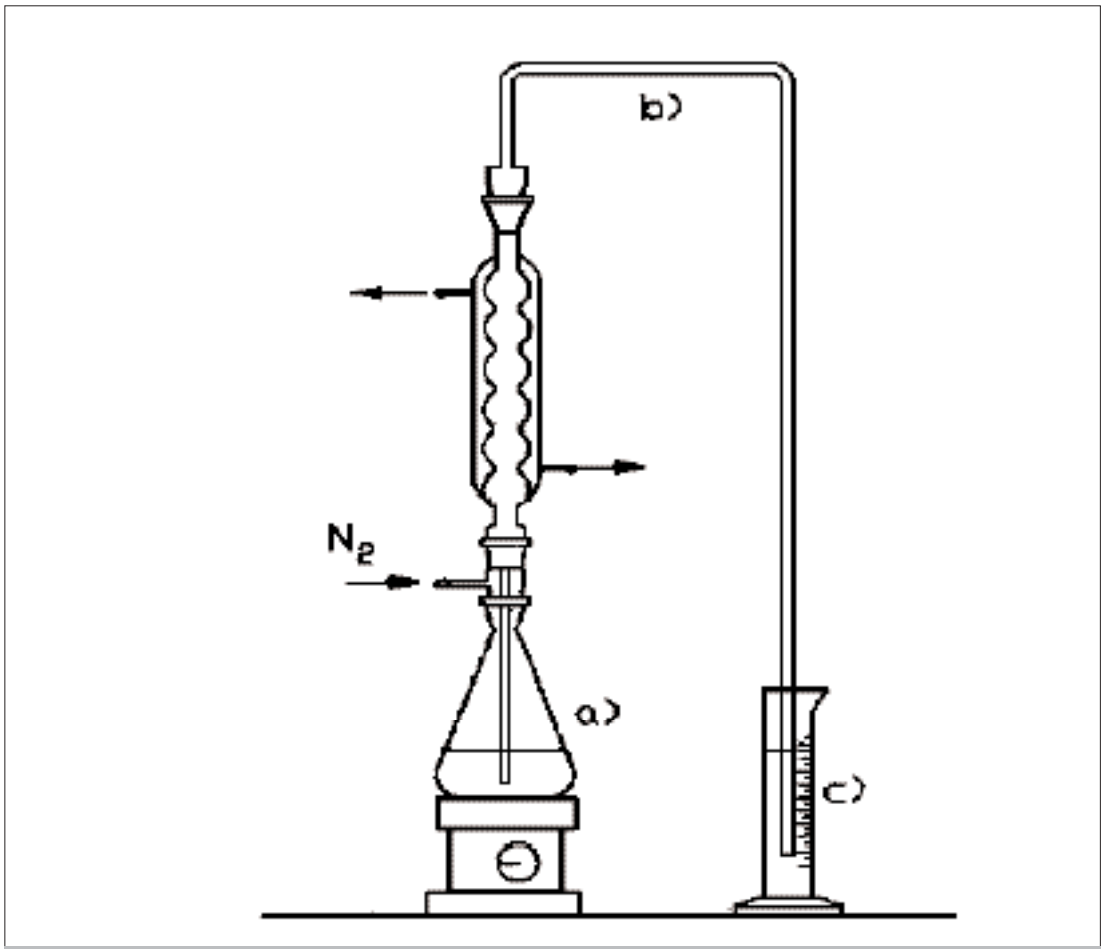


Figura 1: Apparato per la determinazione del COD che consente il recupero del cloro gassoso in presenza di cloruri.

la preparazione della soluzione di tiosolfato e dell'indicatore, tenendo presenti le modifiche da apportare per la più bassa normalità del tiosolfato.
Operare nelle condizioni previste dalla procedura A (7.3.1), che comunque consente una riduzione del termine correttivo da sottrarre, facendo gorgogliare azoto dall'inizio e per tutta la durata dell'ebollizione con un flusso di 1-2 bolle per secondo e aumentando tale flusso leggermente in fase di raffreddamento per evitare pericoli di sifonamento. Quindi disconnettere e risciacquare il tubo (b), prelevare il cilindro (c) e procedere alla titolazione con tiosolfato. Il termine correttivo da sottrarre sarà calcolato con la formula:

$$\frac{V_t \cdot N_t \cdot 8000}{V}$$

dove:
V_t = volume (mL) della soluzione di tiosolfato titolante;
N_t = normalità della soluzione di tiosolfato titolante;
8000 = peso equivalente dell'ossigeno moltiplicato per 1000, per riferire il dato al volume di un litro;
V = volume (mL) di campione sottoposto ad analisi.

Sulla beuta (a) procedere come al solito (vedi Paragrafo 7.1) alla determinazione del COD e al valore sperimentale trovato sottrarre il termine correttivo calcolato in precedenza.
Nel caso in cui il campione presenti concentrazioni di Cl^- >10000 mg/L si consiglia il ricorso alle condizioni che prevedono l'utilizzo di dicromato 0,15 N (vedi procedura A1 del Sottoparagrafo 7.3.1). Tali condizioni, oltre ad offrire caratteristiche di qualità del dato legger-

mente superiori rispetto a quelle ottenute con dicromato 0,25 N e rapporto in peso $HgSO_4/Cl^-$ =20, consentono anche di ridurre significativamente sia i costi analitici che l'utilizzo di un metallo, quale il mercurio, molto pericoloso per l'ambiente.

8. Calcoli

La richiesta chimica di ossigeno (COD) viene calcolata applicando la seguente espressione (valida nel caso di assenza di diluizione del campione):

$$C = \frac{(m_1 - m_2) \cdot N \cdot 8000}{V}$$

dove:
C = richiesta chimica di ossigeno (mg/L);
m_1 = mL di soluzione di solfato di ammonio e ferro (II) consumati nella prova in bianco;
m_2 = mL di soluzione di solfato di ammonio e ferro (II) consumati per il campione;
N = normalità della soluzione di solfato di ammonio e ferro (II) impiegata;
8000 = peso equivalente dell'ossigeno moltiplicato per 1000, per riferire il dato al volume di un litro;
V = volume (mL) di campione usato per l'analisi.

Nel caso in cui si utilizzi la procedura A per campioni con Cl^- compreso nell'intervallo 1000-6000 mg/L e il COD sperimentale risulti compreso tra 100 e 200 mg/L sottrarre al valore sperimentale trovato un termine correttivo di 20 unità.
Invece, nel caso in cui si utilizzi la procedura B sottrarre al valore di COD sperimentale calcolato con la formula sopra specificata il valore del termine correttivo relativo al cloro gassoso sviluppato, ottenuto seguendo le modalità descritte al Sottoparagrafo (7.3.2).

9. Qualità del dato

Prove effettuate su 5 repliche di soluzioni contenenti idrogenoftalato di potassio a concentrazioni note comprese rispettivamente tra 160 e 200 mg/L e cloruri a concentrazioni comprese tra 100 e 1000 mg/L hanno fornito valori del coefficiente di variazione, CV (%) = (scarto tipo/valore medio)·100, inferiori all'11%.
Prove eseguite con il metodo Baumann (7.3.2) su soluzioni sintetiche di idrogenoftalato di potassio nel campo di concentrazioni 100-200 mg COD/L, in presenza di diverse concentrazioni di cloruri (2000-20000 mg/L), hanno mostrato valori del coefficiente di variazione inferiori al 15% e valori di accuratezza entro il 12%, in entrambe le condizioni sperimentali specificate al Sottoparagrafo 7.3.1 (procedure A1 e A2).

Si procede periodicamente al controllo del metodo analizzando, secondo il procedimento (7.1), una soluzione contenente 0,4251 g/L di idrogenoftalato di potassio ($C_8H_5KO_4$), (6.10), previamente essiccato a 105°C. Parallelamente si effettua una prova in bianco sempre secondo il procedimento (7.1).
La richiesta chimica di ossigeno di questa soluzione è di 500 mg/L e la prova viene considerato soddisfacente se il recupero è almeno pari al 96% del valore teorico. Analoghi controlli possono essere eseguiti utilizzando soluzioni più diluite di idrogenoftalato di potassio.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA).

ASTM (1981): "*Annual Book of ASTM Standard*", Part 31, Water (Philadelphia).

BAUMANN F.J. (1974): "Dichromate reflux chemical oxygen demand. A proposed method for chloride correction in highly saline wastes", *Anal. Chem.*, **45**, (9), 1336-1338.

BELKIN S., BRENNER A. & ABELIOVICH A. (1992): "Effect of inorganic constituents on chemical oxygen demand - I. Bromides are uneutralizable by mercuric sulfate complexation", *Wat. Res.*, **26**, (12), 1577-1581.

BUIRNS E.R. & MARSHALL C. (1965): "Correction for chloride interference in the chemical oxygen demand test", *J. Water Pollut. Control Fed.*, **37**, 1716-1721.

CRIPPS J.M. & JENKINS D. (1964): "A COD Method Suitable for the Analysis of Highly Saline Waters", *J. Water Pollut. Control Fed.,* **36**, 1240-1246.

EPA (1974): *"Methods for Chemical Analysis of Water and Wastes"*. EPA-625/6-74-003a (Cincinnati, Environmental Research Center).

IRSA (1986): "Criteri e limiti per il controllo dell'inquinamento delle acque", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **75**, 141-142.

PETTINE M., CAPRI S., GIACONI V., LORETI L. & NOTTOLI R. (1992): "Interferenza dei cloruri nella determinazione del COD", *Notiziario IRSA Metodi Analitici per le Acque,* **12,** (4)**,** 35-47.

TALINLI I. & ANDERSON G.K. (1992): "Interference of hydrogen peroxide on the standard COD test", *Wat. Res.,* **26**, (1), 107-110.

5140. Solventi organici aromatici

Introduzione

I solventi aromatici sono i composti a minor peso molecolare e maggiormente volatili appartenenti alla classe degli idrocarburi aromatici. I composti più rappresentativi sono: benzene, toluene, etilbenzene, o-, m- e p-xilene, iso ed n-propilbenzene, stirene. Tali composti risultano particolarmente tossici ed il loro uso è regolato per legge. L'inquinamento da solventi organici aromatici deriva dal loro impiego in campo industriale e dall'uso di prodotti petroliferi (in particolare benzine). La loro diffusione nell'ecosistema acquatico è legata a perdite che si possono verificare durante le fasi di trasporto e stoccaggio di prodotti derivati dal petrolio. Analogamente a quanto osservato per i solventi clorurati, la contaminazione da solventi aromatici interessa più facilmente le falde acquifere rispetto ai corpi idrici superficiali. A differenza dei primi, tuttavia, i solventi aromatici hanno una densità inferiore ed una viscosità superiore a quella dell'acqua che rendono meno favorito il loro movimento verticale verso le falde.

1. Principio del metodo

Il metodo prevede la determinazione dei solventi organici aromatici in campioni acquosi mediante gascromatografia accoppiata a: a) spazio di testa statico (HS); b) spazio di testa dinamico ("Purge & trap"). Soltanto i composti scarsamente solubili in acqua, relativamente volatili, tendono ad occupare lo spazio di testa e quindi possono essere trasferiti nel gascromatografo; in tal modo è possibile minimizzare eventuali interferenze e/o contaminazioni della colonna gascromatografica e del rivelatore.

1.1 Spazio di testa statico

L'analisi in spazio di testa statico consiste nell'analisi della fase vapore del campione, in equilibrio con la fase liquida, in una fiala ("vial") riscaldata a temperatura costante. La distribuzione dei composti organici tra le due fasi dipende dalla temperatura, dalla tensione di vapore dei singoli composti, dall'influenza della matrice del campione sui coefficienti di attività degli analiti e dal rapporto tra il volume dello spazio di testa e il volume di liquido nella fiala. Anche l'aggiunta di un sale solubile fino a saturazione può influire su detta distribuzione. Nel metodo proposto il campione acquoso, prelevato direttamente dal recipiente utilizzato per il prelievo, viene introdotto in fiale di adeguato volume che vengono chiuse ermeticamente e poste in termostato ad una temperatura e per un tempo definiti; un certo volume di fase vapore viene quindi iniettato in un gascromatografo munito di una colonna contenente una fase stazionaria di media polarità e di un rivelatore a ionizzazione di fiamma di idrogeno (FID). L'identificazione degli idrocarburi aromatici presenti è fatta in base ai tempi di ritenzione dei diversi picchi, avendo cura di mantenere costante la portata del gas di trasporto e badando all'accuratezza delle temperature del forno individuate per l'analisi.
Le determinazioni quantitative si basano sul confronto fra le aree dei picchi ottenuti iniettando il campione e le aree dei picchi prodotti da soluzioni di taratura.

1.2 Spazio di testa dinamico

L'analisi in spazio di testa dinamico, proposta in alternativa, consente di raggiungere eleva-

te sensibilità. Il metodo prevede l'estrazione dalla matrice acquosa di sostanze organiche volatili, con bassa solubilità in acqua, mediante il gorgogliamento di un gas inerte in un determinato volume di campione. I composti così estratti vengono intrappolati in un apposito materiale adsorbente. Terminata l'estrazione, la trappola viene riscaldata e gli analiti sono trascinati da un flusso di gas inerte in testa alla colonna cromatografica, separati e quindi rivelati da un rivelatore FID oppure da uno più selettivo quale quello a fotoionizzazione (PID), sensibile ai legami multipli. Successivamente gli analiti vengono identificati mediante i tempi di ritenzione e quantificati in modo del tutto analogo al metodo precedente.
Con opportune scelte tecniche (vedi Appendice), il sistema analitico può essere reso idoneo alla determinazione contemporanea di "solventi organici aromatici" e "solventi clorurati".

2. Campo di applicazione

Il metodo descritto, nelle due diverse modalità, consente la determinazione di benzene, toluene, xileni, etilbenzene, iso ed n-propilbenzene, stirene in acque di scarico e superficiali.
Il metodo statico è utilizzabile per concentrazioni di ciascuno dei composti sopra elencati a partire da 10 µg/L. Per taluni composti, in particolari condizioni strumentali è possibile rilevare concentrazioni anche inferiori a 0,1 µg/L. Il metodo dinamico è in grado di rivelare concentrazioni di 0,1 µg/L di ogni singolo idrocarburo aromatico. Per la sua elevata sensibilità questo metodo è applicabile anche alle acque sotterranee.

3. Interferenze e cause di errore

Composti organici diversi dagli idrocarburi aromatici sopra elencati possono avere tempi di ritenzione coincidenti con quelli dei composti in esame. I loro effetti non possono essere evitati o ridotti, come accade nel caso dei rivelatori selettivi, a causa del principio di funzionamento del rivelatore usato che è di tipo universale. Per eliminare tali effetti è necessario introdurre i campioni in due o più colonne di diversa polarità.
Le colonne capillari consentono di ottenere, generalmente, una buona sensibilità ed affidabilità nella determinazione degli analiti in oggetto. L'uso di tali colonne con annessa precolonna permette infatti una buona separazione dei picchi delle sostanze da analizzare da quelli delle sostanze interferenti. La separazione può essere migliorata aumentando la lunghezza della colonna, con conseguente allungamento dei tempi di analisi. Sarà opportuno trovare il miglior compromesso tra risoluzione, durata dell'analisi e sensibilità.
La presenza di composti altobollenti parzialmente coestratti può creare difficoltà durante l'analisi allungandone sensibilmente i tempi. Per rimuovere detti composti è necessario elevare la temperatura della colonna cromatografica fino al valore massimo consentito dalla fase stazionaria impiegata e attendere che la linea di base si stabilizzi prima di passare al raffreddamento del forno e all'introduzione del campione successivo.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento dell'acqua da analizzare deve essere effettuato in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". Si consiglia l'uso di bottiglie di vetro, chiuse con un tappo a smeriglio di vetro, accuratamente pulite per evitare contaminazioni del campione e risciacquate con l'acqua da analizzare immediatamente prima dell'uso. Non filtrare l'acqua ed evitare ogni operazione che faciliti il degasaggio dei composti organici volatili disciolti.
Riempire la bottiglia fino all'orlo e tappare subito evitando di lasciare spazi gassosi nei quali possano passare i composti più volatili che andrebbero perduti all'apertura della bottiglia, fornendo risultati in difetto.
Le analisi devono essere effettuate al più presto e in ogni caso non oltre 48 ore dal prelievo, conservando il campione in frigorifero a 4°C nel periodo d'attesa.

5. Apparecchiature

5.1 *Bottiglie di vetro* per la raccolta del campione con tappo a tenuta (capacità almeno 100 mL).

5.2 *Flaconcini di vetro ("vials")* adatti per la tecnica in spazio di testa statico, di idonea capacità, con tappo con ghiera di alluminio e guarnizione in silicone teflonata, a chiusura ermetica.

5.3 *Matracci o palloni tarati* di vario volume per la preparazione e la diluizione delle soluzioni a concentrazione nota dei diversi idrocarburi aromatici e per la preparazione delle soluzioni di riferimento per la taratura.

5.4 *Pipette tarate* di vario volume a doppia tacca, classe A.

5.5 *Spatola d'acciaio* per pesate di sostanze solide.

5.6 *Microsiringhe* per liquidi da 10 µL, 50 µL, 250 µL.

5.7 *Siringa per gas* con ago sostituibile da 100-1000 µL (in assenza di autocampionatore).

5.8 *Pinze* per chiusura ed apertura delle "vials".

5.9 *Bilancia tecnica*, risoluzione 0,1 g.

5.10 *Bilancia analitica*, risoluzione 0,1 mg.

5.11 *Gascromatografo*, dotato di un forno per le colonne di sufficiente capacità e di un rivelatore a ionizzazione di fiamma di idrogeno ed eventualmente dotato di autocampionatore idoneo a lavorare alla temperatura selezionata per la termostatazione. Le temperature di iniettore, forno e rivelatore debbono essere controllabili in modo indipendente.

5.12 *Colonna cromatografica*: capillare di vetro o silice fusa con fase stazionaria di media polarità, di opportuna lunghezza e diametro interno; precolonna di pari diametro.

5.13 *Termostato* indipendente per campioni e soluzioni di riferimento, per i casi in cui il gascromatografo non sia dotato di autocampionatore termostatato.

5.14 *Elaboratore di dati cromatografici* per la misura delle aree dei picchi ed eventualmente per l'impiego di un metodo di taratura esterna o interna, con possibilità di stampa di dati e cromatogrammi.

Per il metodo in spazio di testa dinamico oltre alla vetreria, microsiringhe, colonne ed accessori cromatografici già indicati si ricorre a:

5.15 *Siringhe monouso* da 5 e 10 mL.

5.16 *Campionatore "Purge and trap"* manuale o automatico.

5.17 *Trappola* costituita da idoneo materiale adsorbente.

5.18 *Gascromatografo* dotato di rivelatore FID oppure a fotoionizzazione.

La vetreria e i materiali impiegati devono essere riservati alla procedura analitica in oggetto. La vetreria di cui ai punti 5.1, 5.2, 5.3 dopo il lavaggio va trattata a 180-200°C per alme-

no 3 ore; i tappi e le guarnizioni vanno lavati in n-pentano e asciugati in stufa a 90°C. Le fiale devono essere trattate di norma a 200°C per almeno 3 ore; nel caso di presenza di composti altobollenti, le fiale andranno trattate a temperature superiori, anche 400°C, ed eventualmente con miscela cromica. All'interno delle siringhe per campionamento gas deve essere fatto passare un flusso di gas inerte dopo ogni iniezione.

6. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e l'acqua utilizzata deve essere esente da sostanze organiche.

6.1 Elio o idrogeno puro per gascromatografia, usato come gas di trasporto, eventualmente passato attraverso una trappola a setacci molecolari tipo 5 A.

6.2 Idrogeno e aria puri per gascromatografia usati come combustibile e comburente per il rivelatore a ionizzazione di fiamma di idrogeno, eventualmente purificati attraverso trappole a setacci molecolari tipo 5 A.

6.3 Setacci molecolari tipo 5 A attivati a 350°C per alcune ore in corrente di gas inerte.

6.4 Cloruro di sodio (NaCl)

6.5 Alcol metilico (CH_3OH)

6.6 Idrocarburi aromatici (benzene, toluene, etilbenzene, o-, m-, p–xilene, isopropilbenzene, n-propilbenzene, stirene) di elevata purezza per la preparazione delle soluzioni di riferimento.

Verificare che ogni composto dia un solo picco cromatografico nelle condizioni di lavoro previste per le soluzioni di riferimento. In considerazione della composizione molto variabile dei campioni d'acqua da analizzare, è opportuno disporre anche di soluzioni di riferimento di singoli composti oltre che delle miscele.

6.7 Trifluorobenzene, oppure *1-Cloro-2-Fluorobenzene*, oppure altra sostanza idonea ad essere usata quale riferimento interno per determinazioni sia di idrocarburi aromatici che di composti organoalogenati.

7. Procedimento

7.1 Spazio di testa statico

7.1.1 Preparazione delle soluzioni concentrate (1 mg/mL di ciascun idrocarburo aromatico)

Per determinare le concentrazioni dei diversi idrocarburi aromatici presenti nel campione in esame è consigliabile preparare soluzioni a concentrazione nota dei diversi composti in acqua e applicare a queste la stessa tecnica di preparazione usata per campioni incogniti (7.1.4). Pesare 100 mg di ciascun composto da dosare trasferendo con una microsiringa un'aliquota della soluzione di riferimento commerciale in palloni tarati da 100 mL. Il volume dell'aliquota da prelevare si può calcolare dal valore della densità del riferimento utilizzato. L'accuratezza dei volumi prelevati viene verificata attraverso la pesata del singolo analita. Portare a volume con metanolo (6.5) mescolando con cura. Queste soluzioni, conservate in frigorifero, sono stabili un mese.

7.1.2 Preparazione della soluzione mista (0,01 mg/mL di ciascun idrocarburo aromatico)

In un pallone tarato da 100 mL introdurre circa 80 mL di metanolo e aggiungere con una pipetta 1 mL di ciascuna delle soluzioni 7.1.1. Portare a volume con metanolo mescolando con cura.

7.1.3 Preparazione della soluzione diluita (0,1 mg/L di ciascun idrocarburo aromatico)

In un pallone tarato da 100 mL introdurre circa 90 mL di acqua esente da sostanze organiche e addizionare con una pipetta 1 mL della soluzione 7.1.2. Portare a volume mescolando con cura. Questa soluzione acquosa deve essere preparata quotidianamente. A partire da questa soluzione (o eventualmente da una di maggior concentrazione) preparare almeno tre diverse soluzioni di taratura e ricavare le rette di taratura per i singoli composti.

7.1.4 Preparazione del campione

Introdurre un idoneo volume di campione (generalmente da 5 a 15 mL) in una "vial" da 10 mL o 20 mL, in modo che il volume di liquido sia circa 3/4 del totale, prelevandola direttamente dal recipiente utilizzato per il prelievo; saturare con cloruro di sodio, chiudere la "vial" ermeticamente e agitare vigorosamente per favorire la dissoluzione del sale; termostatare alla temperatura e per il tempo predeterminati.

7.1.5 Analisi

Analizzare almeno tre soluzioni di riferimento, seguendo la procedura indicata in (7.1.4) per la preparazione del campione e applicando le condizioni riportate in Tab. 1. Tali condizioni hanno carattere esemplificativo e potranno essere ottimizzate dagli operatori in funzione della strumentazione disponibile e della matrice analizzata.
Eseguire l'analisi dei campioni preparati seguendo la procedura (7.1.4) applicando le stesse condizioni operative utilizzate per la costruzione delle curve di taratura. Identificare i diversi composti presenti nel campione confrontando i tempi di ritenzione dei picchi presenti nei cromatogrammi del campione e delle soluzioni di riferimento, acquisiti nelle stesse condizioni cromatografiche. Misurare le aree di ciascun picco nei cromatogrammi ottenuti e calcolare la concentrazione di ciascun idrocarburo aromatico tramite confronto con le rette di taratura.

Tabella 1: Condizioni operative tipiche per l'analisi mediante spazio di testa statico

Temperatura campione	80°C
Tempo di termostatazione	20 minuti
Temperatura iniettore	200-250°C
Volume iniettato della fase vapore	100 µL (manualmente o mediante autocampionatore)

Verificare giornalmente, utilizzando almeno due soluzioni di riferimento diverse, che i risultati ottenuti siano entro la variabilità analitica definita al Paragrafo (9.1).
Tale metodo (riferimento esterno) presuppone la possibilità di introdurre quantità di campione molto esatte o comunque molto riproducibili (si presta pertanto all'uso di autocampionatori). In caso contrario è opportuno usare la tecnica del riferimento interno. In tal caso, addizionare alle soluzioni di riferimento e ad ogni campione una soluzione di riferimento interno in concentrazione tale da avere un picco di area apprezzabile. È necessario un dosaggio del volume di riferimento interno estremamente riproducibile al fine di ottenere la medesima concentrazione in tutte le soluzioni.
Un esempio di cromatogramma di una soluzione mista di riferimento (20 µg/L, per ciascun analita) ottenuto con l'analisi mediante spazio di testa statico è riportato in Fig. 1.

7.2 Spazio di testa dinamico

7.2.1 Preparazione delle soluzioni di riferimento

Preparare una soluzione in metanolo contenente 0,2 mg/mL di ciascun idrocarburo aromatico da dosare. Tale soluzione, conservata a 4°C, è stabile un mese. Dalla soluzione precedente preparare una soluzione intermedia di 2 mg/L in metanolo, a partire dalla quale preparare almeno tre differenti soluzioni, in acqua, con cui allestire idonee rette di taratura per ogni composto. Esempio di concentrazioni utilizzabili per la taratura: 0,5 mg/L; 5 mg/L; 20 mg/L. Dette soluzioni vanno preparate al momento dell'uso.

7.2.2 Analisi

Le soluzioni di riferimento (almeno tre) e i campioni incogniti vengono introdotti direttamente, o mediante autocampionatore, nel dispositivo "Purge and trap" in volume opportuno, generalmente variabile da 5 mL a 10 mL. Applicare le condizioni riportate in Tab. 2. Tali condizioni hanno carattere esemplificativo e potranno essere ottimizzate dagli operatori in funzione della strumentazione disponibile e della matrice analizzata.

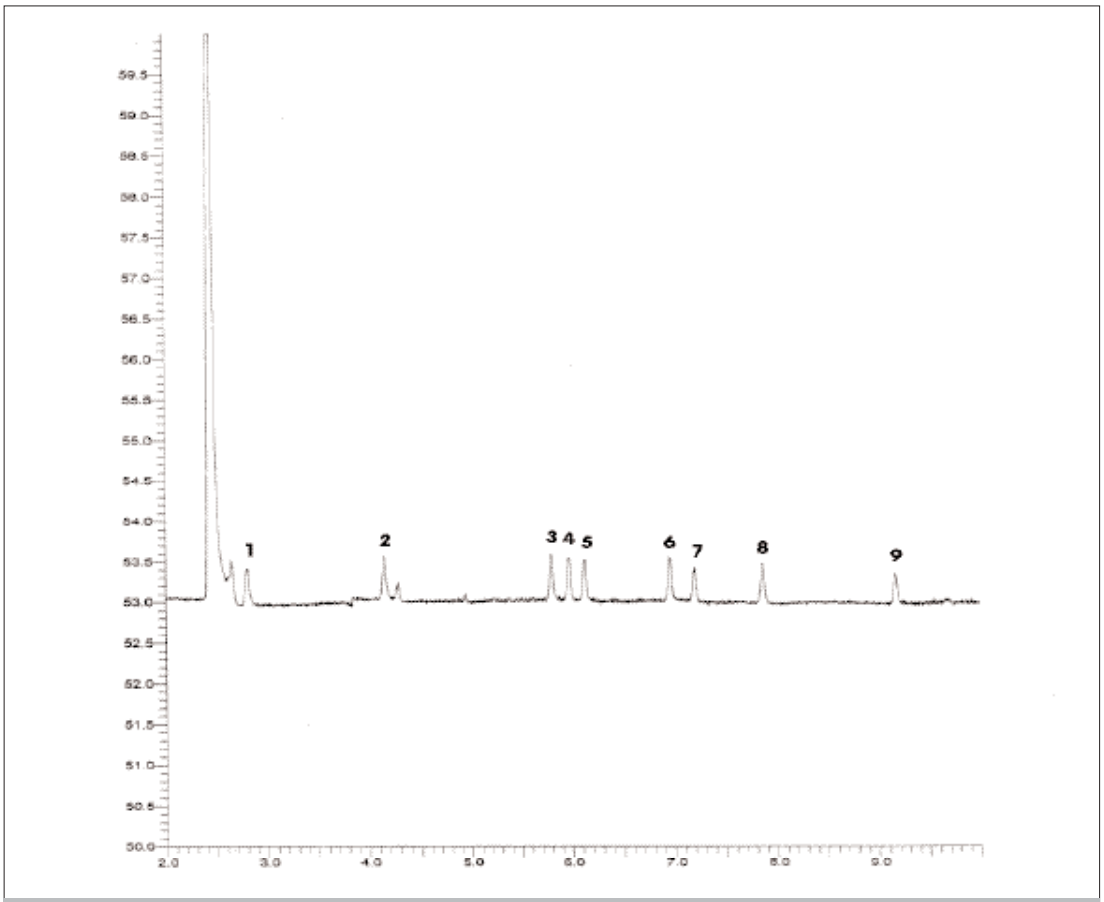


Figura 1: Gascromatogramma di una soluzione mista di riferimento (20 µg/L, per ciascun analita) analizzata con lo spazio di testa statico. Condizioni gascromatografiche. Precolonna di silice fusa senza fase, di pari diametro della colonna analitica; colonna gascromatografica: DB WAX, lunghezza: 30 m, diametro interno (i.d.)=0,32 mm, spessore film minimo=0,25 µm; temperatura iniettore: 250°C; temperatura del rivelatore (FID): 270°C; gas di trasporto: elio o idrogeno puri per gascromatografia; Programma di temperatura - TEMP1: 40°C; TIME1: 2 minuti; RATE1: 5°C/min; TEMP2: 100°C; TIME2: 0 minuti; RATE2: 10°C/min; TEMP3: 160°C; TIME3: 0 minuti.
1=benzene; 2=toluene; 3=etilbenzene; 4=p-xilene; 5=m-xilene; 6=cumene; 7=o-xilene; 8=n-propilbenzene; 9=stirene.

Identificare i diversi composti presenti nel campione confrontando i tempi di ritenzione dei picchi presenti nei cromatogrammi del campione e delle soluzioni di riferimento. Il campione e le soluzioni di riferimento devono essere iniettati nelle stesse condizioni. Misurare le aree di

Tabella 2: Condizioni operative tipiche per l'analisi mediante spazio di testa dinamico	
Temperatura iniziale trappola	Una temperatura bassa (meglio se <0°C, comunque non >25°C) garantisce una migliore possibilità di intrappolamento per gli analiti, soprattutto quelli più volatili.
"Purge"	In questa fase il gas passa attraverso il campione, contenuto in apposita ampolla, e gorgoglia alcuni minuti trasferendo gli analiti alla trappola; tempo di gorgogliamento consigliato: 12 minuti; flusso 40 mL/min.
"Dry purge"	Serve a rimuovere l'acqua o l'eventuale umidità dalla trappola. Durata: circa un minuto.
"Desorb preheat"	È usato per riscaldare la trappola ad alta temperatura in modo che gli analiti vengano rilasciati dall'adsorbente: in questa fase non vi è flusso di gas; temperatura consigliata 230°C.
Desorbimento	Gli analiti vengono desorbiti dalla trappola dal gas di trasporto e trasferiti al gascromatografo: in questa fase, della durata di circa 4 minuti, la temperatura consigliata è di 250°C.
Pulizia	In questa fase, in cui il gas passa attraverso il sistema per rimuovere eventuali residui di analiti e tracce di umidità rimaste nel sistema, la trappola è portata ad alta temperatura (280°C o superiore) per un tempo di almeno 15 minuti. Dopo questa fase si ritorna alle condizioni di "stand by".
Trappola	Tenax oppure carbone o altri materiali adsorbenti o loro miscele.
Gas di "make up"	Elio (30 mL/min).

ciascun picco nei cromatogrammi ottenuti e calcolare la concentrazione di ciascun idrocarburo aromatico tramite confronto con le rette di taratura.
Verificare giornalmente, utilizzando almeno due soluzioni di riferimento diverse, che i risultati ottenuti siano entro la variabilità analitica definita al Paragrafo (9.2).
Tale metodo (riferimento esterno) presuppone la possibilità di introdurre quantità di campione molto esatte o comunque molto riproducibili (si presta pertanto all'uso di autocampionatori). In caso contrario è opportuno usare la tecnica del riferimento interno. In tal caso, addizionare alle soluzioni di riferimento e ad ogni campione una soluzione di riferimento interno in concentrazione tale da avere un picco di area apprezzabile. È necessario un dosaggio del volume di riferimento interno estremamente riproducibile al fine di ottenere la medesima concentrazione in tutte le soluzioni.
Un esempio di cromatogramma di una soluzione mista di riferimento (2 μg/L, per ciascun analita) ottenuto con l'analisi mediante spazio di testa dinamico è riportato in Fig. 2.

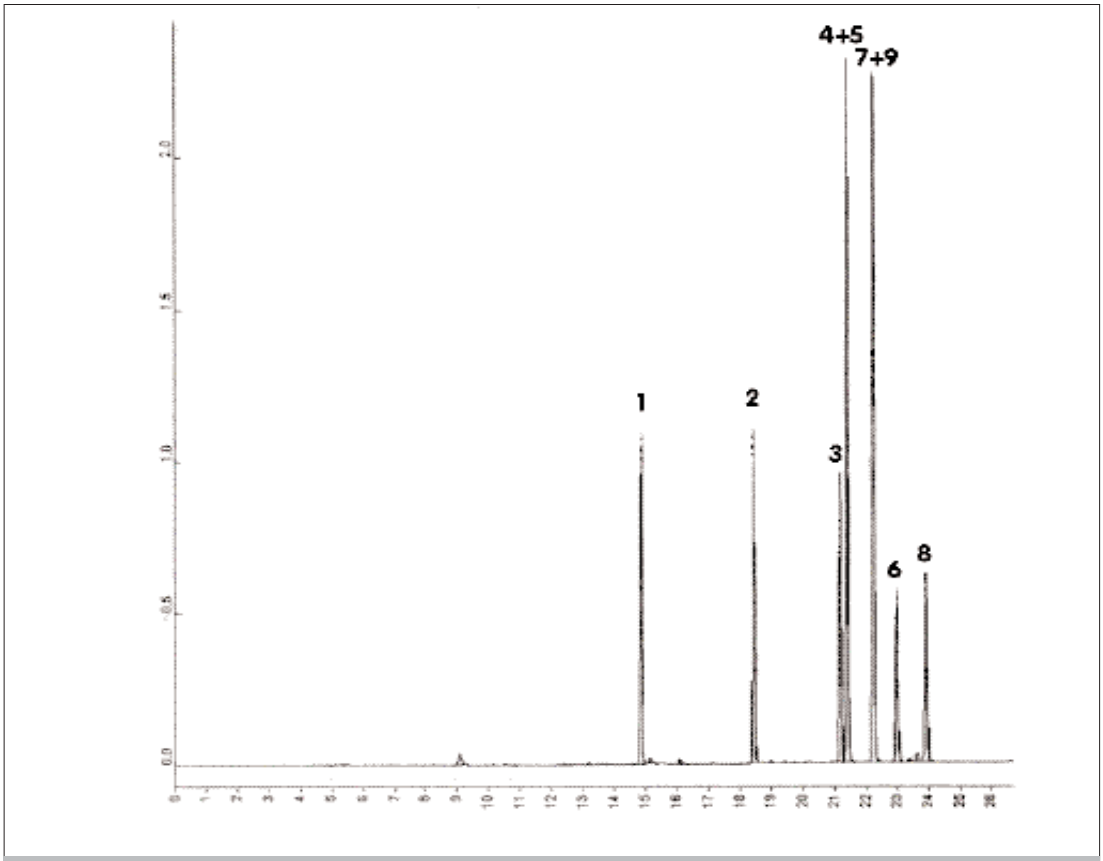


Figura 2: Gascromatogramma di una soluzione mista di taratura (2 µg/L, per ciascun analita) analizzata con lo spazio di testa dinamico. Condizioni gascromatografiche. Precolonna: di silice fusa senza fase, di pari diametro della colonna analitica; colonna gascromatografica: DB 624; lunghezza: 75 m; diametro interno (i.d.): 0,53 mm; temperatura del rivelatore (PID): 250°C; gas di trasporto: elio o idrogeno puri per gascromatografia; Programma di temperatura - TEMP1: 37°C; TIME1: 8 minuti; RATE1: 10°C/min; TEMP2: 160°C; TIME2: 12 minuti; RATE2: 20°C/min; TEMP3: 200°C; TIME3: 5,7 minuti.
1=benzene; 2=toluene; 3=etilbenzene; 4=p-xilene; 5=m-xilene; 6=cumene; 7=o-xilene; 8=n-propilbenzene; 9=stirene.

8. Calcoli

8.1 Metodo di taratura diretta o con riferimento esterno

Costruire le rette di taratura per i singoli analiti, accertandosi di operare nel campo linearità dello strumento, riportando in grafico l'area del picco del composto (A) in funzione della concentrazione del composto stesso ed interpolando i punti sperimentali con il metodo dei minimi quadrati. Ricavare il coefficiente angolare (a) e l'intercetta (b) della retta di taratura.
La concentrazione incognita di ogni composto è data dalla relazione:

$$C = \frac{A - b}{a} \cdot \frac{V_f}{V_i}$$

dove:
C = concentrazione (µg//L) del composto incognito;
A = area del picco dell'analita nella miscela incognita;
b = valore dell'intercetta della retta di taratura;
a = valore del coefficiente angolare della retta di taratura;
V_f = volume (mL) dell'estratto finale;
V_i = volume (mL) del campione acquoso.

8.2 Metodo con riferimento interno

Nel caso in cui si utilizzi il riferimento interno, riportare in grafico il rapporto area picco composto/area picco riferimento interno (A/A_{si}) in funzione della concentrazione del composto stesso. La concentrazione incognita di ogni composto è data dalla relazione:

$$C = \frac{A/A_{si} - b}{a} \cdot \frac{V_f}{V_i}$$

dove:
C = concentrazione (µg/L) del composto incognito;
A = area del picco dell'analita nella miscela incognita;
A_{si} = area del picco di riferimento interno nella miscela incognita;
b = valore dell'intercetta della retta di taratura;
a = valore del coefficiente angolare della retta di taratura;
V_f = volume (mL) dell'estratto finale;
V_i = volume (mL) del campione acquoso.

Accertarsi che la concentrazione del campione sia all'interno dell'intervallo di concentrazione utilizzato per la curva di taratura.

9. Qualità del dato

9.1 Spazio di testa statico

Prove effettuate (n=5) da tre laboratori su soluzioni sintetiche di acqua deionizzata contenenti 20 µg/L di ciascun analita hanno fornito valori del coefficiente di variazione, CV(%) = (scarto tipo/valore medio)·100, compresi tra 2,5% e 7,7% e recuperi tra il 91% e il 105%. Va tenuto presente che la precisione e l'accuratezza di un metodo generalmente peggiorano all'aumentare della complessità della matrice.

9.2 Spazio di testa dinamico

Prove effettuate (n=5) da cinque laboratori su soluzioni sintetiche di acqua deionizzata contenenti 2 µg/L di ciascun analita hanno fornito valori del coefficiente di variazione compresi tra 2,0% e 3,4% e recuperi tra l'87% e il 100%. Va tenuto presente che la precisione e l'accuratezza di un metodo generalmente peggiorano all'aumentare della complessità della matrice.

Nota: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".*
Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

APPENDICE

A) Spazio di testa statico

Il sistema analitico può essere adattato alla contemporanea determinazione dei"solventi clo-

rurati". Si può utilizzare un gascromatografo bicolonna, oppure operare una scelta accurata di un'unica colonna di fase opportuna (ad esempio 94% metilpolisilossano e 6% cianopropilfenilpolisilossano), un doppio rivelatore di cui uno selettivo per le sostanze alogenate (ECD) ed uno universale (FID) e un sistema di elaborazione dati in grado di acquisire i dati da due rivelatori contemporaneamente. Nel caso si utilizzino due colonne, gli analiti in ingresso all'iniettore verranno ripartiti, dopo la precolonna e tramite "press-fit", alle due diverse colonne cromatografiche collegate ai due diversi rivelatori. In questo caso si ricorrerà all'iniezione di un volume maggiore di campione.
Nel caso si utilizzi una sola colonna, il rivelatore FID verrà montato in parallelo all'ECD: un partitore di flusso all'uscita della colonna cromatografica, suddividerà il flusso tra i due rivelatori permettendo di analizzare anche campioni contenenti quantità elevate di composti clorurati o di confermare sostanze per le quali il tempo di ritenzione non sia l'elemento univoco di riconoscimento.

B) Spazio di testa dinamico

Utilizzando una colonna di lunghezza superiore alle normali capillari impiegate per spazio di testa statico, e cioè da 75 m, e due rivelatori in parallelo, il rivelatore a fotoionizzazione PID e l'ELCD, si può fare riferimento a metodiche in grado di determinare contemporaneamente fino a 60 composti, tra idrocarburi aromatici e alogenoderivati.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard methods for the examination of water and wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA).

U.S. Environmental Protection Agency (1991): "*Volatile organic compounds in water by purge and trap capillary column gas cromatography with photoionization and electrolitic conductivity detectors in series*". Method 502.2 in "*Methods for the determination of organic compounds in finishing drinking water and raw source water*. U.S. Environmental Protection Agency, Environmental Monitoring and Support Lab., Cincinnati, Ohio.

5150. Solventi clorurati

Introduzione

I solventi clorurati fanno parte di una classe di composti organoalogenati ampiamente diffusi nell'ambiente, con serie conseguenze sulla salute umana a causa della presunta o accertata cancerogenicità di alcuni di questi (es. cloruro di vinile, cloroformio, tetraclorometano, 1,2-dicloroetano). L'inquinamento da solventi clorurati deriva dal loro massiccio impiego in campo civile e industriale (sgrassaggio di superfici metalliche, smacchiatura di tessuti, lavorazione di plastica, gomma, carta, produzione di aerosols, adesivi, vernici, sintesi di sostanze chimiche tra le quali i fumiganti) e da operazioni di smaltimento improprio. A causa della scarsa biodegradabilità di questi composti, gli effetti sull'ambiente di contaminanti sversati nel passato sono tuttora presenti.
Per la loro volatilità, queste sostanze possono contaminare le acque superficiali essenzialmente in prossimità dei siti di sversamento. Più facilmente interessano le falde acquifere, in quanto la densità di questi composti, generalmente più alta di quella dell'acqua, e la viscosità considerevolmente minore ne favoriscono il movimento verticale verso le falde. In numerose di queste i livelli di concentrazione raggiunti hanno largamente compromesso l'utilizzo della risorsa idrica.
È documentata, inoltre, la formazione di trialometani nei processi di disinfezione a seguito della reazione del cloro attivo con gli acidi umici e con altre sostanze organiche presenti nelle acque.

1. Principio del metodo

Il metodo prevede la determinazione di composti organoalogenati in campioni acquosi mediante gascromatografia accoppiata a spazio di testa statico (HS) ed a spazio di testa dinamico ("Purge & trap"). Soltanto i composti scarsamente solubili in acqua, relativamente volatili, tendono ad occupare lo spazio di testa e quindi possono essere trasferiti nel gascromatografo; in tal modo è possibile minimizzare eventuali interferenze e/o contaminazioni della colonna gascromatografica e del rivelatore.

1.1 Spazio di testa statico

L'analisi in spazio di testa statico consiste nell'analisi della fase vapore del campione, in equilibrio con la fase liquida, in una fiala ("vial") riscaldata a temperatura costante. La distribuzione dei composti organici tra le due fasi dipende dalla temperatura, dalla tensione di vapore dei singoli composti, dall'influenza della matrice del campione sui coefficienti di attività degli analiti e dal rapporto tra il volume dello spazio di testa e il volume di liquido nella fiala. Anche l'aggiunta di un sale solubile fino a saturazione può influire su detta distribuzione.
Nel metodo proposto il campione acquoso, prelevato direttamente dal recipiente utilizzato per il prelievo, viene introdotto in fiale di adeguato volume, che vengono chiuse ermeticamente e poste in termostato ad una temperatura e per un tempo definiti. In condizioni operative tipiche, 100 µL di fase vapore sono iniettati iniettati in un gascromatografo munito di una colonna contenente una fase stazionaria che consenta di isolare senza interferenze i diversi alogenoderivati presenti e successivamente di tollerare temperature elevate per lo spurgo di eventuali sostanze altobollenti coestratte.
La rivelazione dei composti è fatta con sorgente a ^{63}Ni (rivelatore a cattura di elettroni o ECD),

che possiede l'elevata sensibilità richiesta, elimina o riduce fortemente le interferenze da parte dei composti che non contengono alogeni e sopporta le temperature necessarie per evitare condensazioni di altobollenti eventualmente parzialmente coestratti. L'identificazione è fatta in base ai tempi di ritenzione dei diversi picchi, avendo cura di mantenere costante la portata del gas di trasporto e badando all'accuratezza delle temperature del forno individuate per l'analisi.
Il calcolo delle concentrazioni è fatto tramite confronto fra le aree dei picchi ottenuti iniettando il campione e le aree dei picchi prodotti da soluzioni di riferimento.

1.2 Spazio di testa dinamico

L'analisi in spazio di testa dinamico, proposta in alternativa, consente di raggiungere elevate sensibilità. Il metodo prevede l'estrazione dalla matrice acquosa di sostanze organiche volatili, con bassa solubilità in acqua, mediante il gorgogliamento di un gas inerte in un determinato volume di campione. I composti così estratti vengono intrappolati in un apposito materiale adsorbente. Terminata l'estrazione, la trappola viene riscaldata e gli analiti sono trascinati da un flusso di gas inerte in testa alla colonna cromatografica, separati e quindi rivelati da un rivelatore ECD oppure dal rivelatore ELCD (o rivelatore a effetto Hall). La risposta di quest'ultimo è indipendente, a differenza di quella del primo, dal numero di alogeni presenti nella molecola. Successivamente gli analiti vengono identificati mediante i tempi di ritenzione e quantificati in modo del tutto analogo al metodo precedente.
La disponibilità di un rivelatore di massa permette un ulteriore più sicura identificazione degli analiti.
Con opportune scelte tecniche (vedi Appendice), il sistema analitico può essere reso idoneo alla determinazione contemporanea di "solventi organici aromatici" e "solventi clorurati".

2. Campo di applicazione

Il metodo descritto, nelle due diverse modalità, consente la determinazione in acque di scarico e superficiali dei composti riportati in Tab. 1.

Tabella 1: Sostanze determinate
vinilcloruro
cloroformio
1,1,1-tricloroetano
tetraclorometano
tricloroetilene
tetracloroetilene
1,1-dicloroetilene
1,2-dicloroetano
cis- e trans-dicloroetilene
1,2-dicloropropano
1,1,2-tricloroetano
1,1,2,2-tetracloroetano

Il metodo può essere esteso anche ad altri composti alogenati che abbiano punti di ebollizione comparabili quali, ad esempio, il clorodibromometano, il diclorobromometano e il bromoformio.
Il metodo dinamico si presta anche alla determinazione di composti più altobollenti quali l'1,2,4-triclorobenzene e l'esaclorobutadiene.
Nel metodo statico le caratteristiche del rivelatore impiegato (ECD), sensibile al numero di alogeni presenti nella molecola, condiziona il campo di applicazione del metodo. Infatti, mentre i composti plurialogenati sono generalmente rivelabili anche in concentrazioni molto basse (a partire da 0,1 μg/L), i composti meno alogenati hanno limiti di rivelabilità sensibilmente superiori (anche in questo caso variabili da composto a composto e che possono arrivare a qualche decina di μg/L).
Il metodo dinamico è in grado di rivelare concentrazioni di 0,1 μg/L per ogni singolo analita (in qualche caso anche inferiori). Per la sua elevata sensibilità questo metodo è applicabile anche alle acque sotterranee.

3. Interferenze e cause di errore

Il rivelatore selettivo a cattura di elettroni minimizza gli effetti di sostanze interferenti. Le colonne capillari consentono di ottenere, generalmente, una buona sensibilità ed affidabilità nella determinazione degli analiti in oggetto. L'uso di tali colonne con annessa precolonna permette infatti una buona separazione dei picchi delle sostanze da analizzare da quelli delle sostanze interferenti. La separazione può essere migliorata aumentando la lunghezza della colonna, con conseguente allungamento dei tempi di analisi.
La presenza di composti altobollenti parzialmente coestratti può creare difficoltà durante l'analisi allungandone sensibilmente i tempi. Per rimuovere tali composti è necessario elevare la temperatura della colonna cromatografica fino al massimo valore consentito dalla fase stazionaria impiegata e attendere che la linea di base si stabilizzi prima di passare al raffreddamento del forno e all'introduzione del campione successivo.
La presenza di cloro libero residuo nelle acque, proveniente da trattamenti di disinfezione, può alterare sensibilmente i risultati analitici a causa della possibile formazione di trialometani. La presenza di cloro può essere ridotta mediante l'aggiunta di piccole quantità di un riducente al momento del campionamento (ad esempio tiosolfato di sodio).

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento dell'acqua da analizzare deve essere effettuato in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". Si consiglia, inoltre, l'uso di bottiglie di vetro, chiuse con un tappo a smeriglio di vetro, accuratamente pulite per evitare contaminazioni del campione e risciacquate con l'acqua da analizzare immediatamente prima dell'uso. Non filtrare l'acqua ed evitare ogni operazione che faciliti il degasaggio dei composti organici volatili disciolti.
Riempire la bottiglia fino all'orlo e tappare subito, evitando di lasciare spazi gassosi nei quali possano passare i composti più volatili che andrebbero perduti all'apertura della bottiglia fornendo risultati in difetto.
Le analisi devono essere effettuate al più presto e in ogni caso non oltre 48 ore dal prelievo, conservando il campione in frigorifero a 4°C nel periodo d'attesa.

5. Apparecchiature

5.1 Bottiglie di vetro per la raccolta del campione, con tappo a tenuta (capacità almeno 100 mL).

5.2 Camera ermetica a guanti, di dimensioni appropriate per manipolazione di riferimenti e campioni.

Nella determinazione dei solventi organici clorurati nelle acque di scarico le quantità in gioco sono spesso tali per cui si può evitare l'uso della camera a guanti e limitarsi semplicemente a porre attenzione all'eventuale presenza di organoalogenati dispersi nell'atmosfera del laboratorio dove si estraggono i campioni. Preparare le soluzioni di riferimento sotto una cappa ben ventilata. A causa della loro tossicità utilizzare gli idonei dispositivi di protezione individuali (ad es. respiratore) quando si usano questi composti allo stato puro.

5.3 Flaconcini di vetro ("vials"), adatti per la tecnica in spazio di testa statico, di idonea capacità (10-20 mL), con tappo con ghiera di alluminio e guarnizione in silicone teflonata, a chiusura ermetica.

5.4 Matracci o palloni tarati di vario volume, per la preparazione e la diluizione delle soluzioni a concentrazione nota dei diversi composti organoalogenati e per la preparazione delle soluzioni di riferimento per la taratura.

5.5 *Pipette tarate* di vario volume, a doppia tacca, classe A.

5.6 *Spatola d'acciaio* per pesate di sostanze solide.

5.7 *Microsiringhe* per liquidi da 10 µL, 50 µL, 250 µL.

5.8 *Siringa per gas* con ago sostituibile da 100-1000 µL (in assenza di autocampionatore).

5.9 *Pinze* per chiusura ed apertura vials.

5.10 *Bilancia tecnica*, risoluzione 0,1 g.

5.11 *Bilancia analitica*, risoluzione 0,1 mg.

5.12 *Gascromatografo*, dotato di un forno per le colonne di sufficiente capacità e di un rivelatore a cattura di elettroni ed eventualmente dotato di autocampionatore idoneo a lavorare alla temperatura selezionata per la termostatazione. Le temperature di iniettore, forno e rivelatore debbono essere controllabili in modo indipendente.

5.13 *Colonna cromatografica*: capillare di vetro o silice fusa con fase stazionaria di media polarità, di opportuna lunghezza e diametro interno; precolonna di pari diametro.

5.14 *Termostato* indipendente per campioni e soluzioni di riferimento, nei casi in cui il gascromatografo non sia dotato di autocampionatore termostatato.

5.15 *Elaboratore di dati cromatografici* per la misura delle aree dei picchi ed eventualmente per l'impiego di un metodo di taratura con riferimento esterno o interno, con possibilità di stampa di dati e cromatogrammi.

Per il metodo in spazio di testa dinamico oltre alla vetreria, microsiringhe, colonne ed accessori cromatografici già indicati si ricorre a:

5.16 *Siringhe monouso* da 5 e 10 mL.

5.17 *Campionatore "Purge and trap"* manuale o automatico.

5.18 *Trappola* costituita da idoneo materiale adsorbente.

5.19 *Gascromatografo* dotato di rivelatore ECD oppure ELCD.

La vetreria e i materiali impiegati devono essere riservati alla procedura analitica in oggetto. La vetreria di cui ai punti 5.1, 5.3, 5.4 dopo il lavaggio va trattata a 180-200°C per almeno 3 ore e raffreddata prima dell'uso; i tappi e le guarnizioni lavati in n-pentano e asciugati in stufa a 90°C. Le fiale devono essere trattate a 200°C per almeno 3 ore; nel caso di riscontro di composti altobollenti, le fiale andranno trattate a temperature superiori, anche 400°C, ed eventualmente con miscela cromica. Far passare un gas inerte attraverso le siringhe per campionamento gas dopo ogni iniezione.

6. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e l'acqua utilizzata deve essere esente da sostanze organiche.

6.1 *Elio o idrogeno puro per gascromatografia*, usato come gas di trasporto, eventualmente passato attraverso una trappola a carbone attivo e una trappola a setacci molecolari

tipo 5A. Un'ulteriore purificazione può essere fatta tramite passaggio in una trappola per l'eliminazione delle tracce d'ossigeno.

6.2 *Carbone attivo* per l'eliminazione delle impurezze gassose o allo stato di vapore. Va conservato in modo da proteggerlo dall'adsorbimento di impurezze presenti nell'ambiente del laboratorio.

6.3 *Setacci molecolari* tipo 5A attivati a 350°C per alcune ore in corrente di gas inerte.

6.4 *Cloruro di sodio (NaCl)*

6.5 *Alcol metilico (CH_3OH)*

6.6 *Tiosolfato di sodio ($Na_2S_2O_3$)*

6.7 *Composti alogenati* di elevata purezza per la preparazione delle soluzioni di riferimento. Verificare che ogni composto dia un solo picco cromatografico nelle condizioni di lavoro previste per le soluzioni di riferimento. In considerazione della composizione molto variabile dei campioni d'acqua da analizzare, è opportuno disporre anche di soluzioni di riferimento di singoli composti oltre che delle miscele.

6.8 *Trifluorobenzene,* oppure *1-Cloro-2-Fluorobenzene*, oppure altra sostanza idonea ad essere usata quale riferimento interno per determinazioni sia di composti organoalogenati che di idrocarburi aromatici.

6.9 *Alcol n-Propilico* (per spazio di testa dinamico con rivelatore ELCD).

7. Procedimento

7.1 *Spazio di testa statico*

7.1.1 Preparazione delle soluzioni concentrate (10 mg/mL di ciascun composto organoalogenato)

Per determinare le concentrazioni dei diversi composti organoalogenati presenti nel campione in esame è consigliabile preparare soluzioni a concentrazione nota dei diversi composti in acqua e applicare a queste la stessa tecnica di preparazione usata per campioni incogniti (7.1.3). Pesare 100 mg di ciascun composto da dosare trasferendo con una microsiringa un'aliquota dello standard commerciale in palloni tarati da 10 mL contenenti alcuni millilitri di alcol metilico (6.5), in modo da limitare l'evaporazione del composto (*).
Il volume dell'aliquota da prelevare si può calcolare dal valore della densità del riferimento utilizzato. Portare a volume con alcol metilico (6.5) mescolando con cura. Queste soluzioni, conservate in frigorifero, sono stabili un mese.

7.1.2 Preparazione delle soluzioni di riferimento

Preparare una soluzione in metanolo contenente 0,2 mg/mL di ciascun composto organoalogenato da dosare, partendo dalle soluzioni concentrate singole (7.1.1) oppure da soluzioni disponibili in commercio. Tale soluzione, conservata a 4°C, è stabile un mese. Dalla soluzione precedente preparare una soluzione intermedia di 2 mg/L in metanolo e da questa,

(*) La scarsa stabilità delle soluzioni concentrate e la necessità di procedere alla ripreparazione delle stesse una volta al mese suggerisce di preparare 10 mL (invece di 100 mL) di dette soluzioni al fine di minimizzare il volume di residui da smaltire. Nel caso del cloruro di vinile, per evitare di applicare complesse procedure nella preparazione in condizioni di sicurezza della soluzione concentrata a partire dal prodotto puro si ricorre all'utilizzo di soluzioni commerciali a concentrazione nota dell'analita in metanolo.

mediante diluizioni successive, almeno tre soluzioni di taratura, in acqua, a differenti concentrazioni. Le concentrazioni verranno scelte in modo che il livello più basso coincida con il limite di quantificazione(*) e gli altri due cadano all'interno del campo di linearità delle misure. Le concentrazioni dei singoli analiti destinati all'analisi con rivelatore ECD saranno diversificate in base al loro grado di alogenazione e, conseguentemente, al loro grado di rivelabilità (vedi Capitolo 2). Dette soluzioni vanno preparate al momento dell'uso.

7.1.3 Preparazione del campione

Introdurre un idoneo volume di campione (generalmente da 5 a 15 mL) in una "vial" da 10 o 20 mL, in modo che il volume di liquido sia circa i 3/4 del totale, prelevandola direttamente dal recipiente utilizzato per il prelievo. L'aggiunta di un sale (cloruro di sodio) fino a saturazione può favorire il trasferimento degli analiti in fase vapore. In tal caso agitare vigorosamente per favorire la dissoluzione del sale. Chiudere, quindi, la "vial" ermeticamente e termostatare alla temperatura e per il tempo predeterminati.

7.1.4 Analisi

Analizzare almeno tre soluzioni di riferimento, seguendo la procedura indicata in (7.1.3) per la preparazione del campione e applicando le condizioni riportate in Tab. 1. Tali condizioni hanno carattere esemplificativo e potranno essere ottimizzate dagli operatori in funzione della strumentazione disponibile e della matrice analizzata.

Tabella 1: Condizioni operative tipiche per l'analisi mediante spazio di testa statico

Temperatura campione	80 °C
Tempo di termostatazione	20 minuti
Temperatura iniettore	200-250 °C
Volume iniettato della fase vapore	100 µL (manualmente o mediante autocampionatore)

Eseguire l'analisi dei campioni preparati seguendo la procedura (7.1.3) applicando le stesse condizioni operative utilizzate per la costruzione delle curve di taratura. Identificare i diversi composti presenti nel campione confrontando i tempi di ritenzione dei picchi presenti nel cromatogramma del campione e delle soluzioni di taratura, acquisiti nelle stesse condizioni cromatografiche. Misurare le aree di ciascun picco nei cromatogrammi ottenuti e calcolare la concentrazione di ciascun composto organoalogenato tramite confronto con le rette di taratura.
Verificare giornalmente, utilizzando almeno due delle soluzioni di riferimento, che i risultati ottenuti siano entro la variabilità analitica definita al Paragrafo (9.1).
Tale metodo (riferimento esterno) presuppone la possibilità di introdurre quantità di campione molto esatte o comunque molto riproducibili (si presta pertanto all'uso di autocampionatori). In caso contrario è opportuno usare la tecnica del riferimento interno. In tal caso, addizionare alle soluzioni di riferimento e di controllo e ad ogni campione un riferimento interno in concentrazione tale da avere un picco di area apprezzabile. È necessario un dosaggio del volume di riferimento interno estremamente riproducibile al fine di ottenere la medesima concentrazione in tutte le soluzioni.
Un esempio di cromatogrammma di una soluzione per la taratura con concentrazioni dei singoli analiti variabili a seconda del grado di clorurazione, ottenuto con l'analisi mediante spazio di testa statico è riportato in Fig. 1.

(*) Per limite di quantificazione si intende la minima quantità rivelabile e calcolabile con accettabile precisione nelle condizioni di prova e pertanto il valore minimo per il quale è possibile esprimere un risultato.

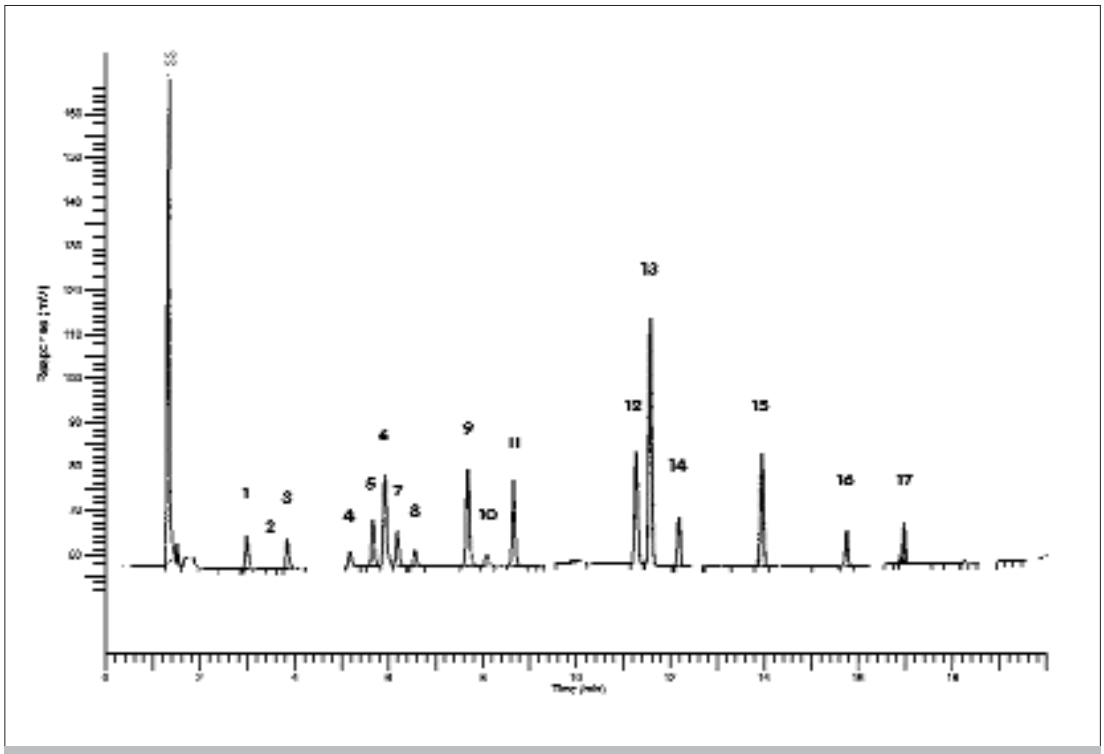


Figura 1: Gascromatogramma di una soluzione di riferimento analizzata con lo spazio di testa statico. Condizioni gascromatografiche. Precolonna di silice fusa senza fase, di pari diametro della colonna analitica, colonna gascromatografica: DB 624, lunghezza=30 m, diametro interno (i.d)=0,32 mm, spessore film minimo=1,8 µm; temperatura iniettore: 250°C; temperatura del rivelatore (ECD): 350°C; gas di trasporto: elio o idrogeno puri per gascromatografia; Programma di temperatura - TEMP1: 40°C; TIME1: 2 minuti; RATE1: 5°C/min; TEMP2: 100°C; TIME2: 0 minuti; RATE2: 10°C/min; TEMP3: 160°C; TIME3: 0 minuti.
1=1,1-dicloroetilene (4 µg/L); 2=diclorometano (impurezza); 3=trans-1,2-dicloroetilene (100 µg/L); 4=cis-1,2-dicloroetilene (100 µg/L); 5=cloroformio (2 µg/L); 6=1,1,1-tricloroetano (2 µg/L); 7=tetracloruro di carbonio (0,2 µg/L); 8=1,2-dicloroetano (100 µg/L); 9=tricloroetilene (2 µg/L); 10=1,2-dicloropropano (100 µg/L); 11=diclorobromometano (2 µg/L); 12=1,1,2-tricloroetano (100 µg/L); 13=tetracloroetilene (2 µg/L); 14=clorodibromometano (2 µg/L); 15=1,1,1,2-tetracloroetano (2 µg/L); 16=bromoformio (4 µg/L); 17=1,1,2,2-tetracloroetano (4 µg/L).

7.2 Spazio di testa dinamico

7.2.1 Preparazione delle soluzioni di riferimento

Preparare una soluzione in metanolo contenente 0,2 mg/mL di ciascun composto organoalogenato da dosare, partendo dalle soluzioni concentrate singole (7.1.1) oppure da soluzioni disponibili in commercio. Tale soluzione, conservata a 4°C, è stabile un mese. Dalla soluzione precedente preparare una soluzione intermedia di 2 mg/L in metanolo e da questa, mediante diluizioni successive, almeno tre soluzioni di taratura, in acqua, a differenti concentrazioni. Le concentrazioni verranno scelte in modo che il livello più basso coincida con il limite di quantificazione (*) e gli altri due cadano all'interno del campo di linearità delle misure. Le concentrazioni dei singoli analiti destinati all'analisi con rivelatore ECD saranno diversificate in base al loro grado di alogenazione e, conseguentemente, al loro grado di rivelabilità (vedi Capitolo 2). Dette soluzioni vanno preparate al momento dell'uso.

7.2.2 Analisi

Le soluzioni di riferimento (almeno tre) e i campioni incogniti vengono introdotti direttamen-

(*) Per limite di quantificazione si intende la minima quantità rivelabile e calcolabile con accettabile precisione nelle condizioni di prova e pertanto il valore minimo per il quale è possibile esprimere un risultato.

te, o mediante autocampionatore, nel dispositivo "Purge and trap" in volume opportuno, generalmente variabile da 5 mL a 10 mL. Applicare le condizioni riportate in Tab. 2. Tali condizioni hanno carattere esemplificativo e potranno essere ottimizzate dagli operatori in funzione della strumentazione disponibile e della matrice analizzata.
Identificare i diversi composti presenti nel campione confrontando i tempi di ritenzione dei picchi presenti nei cromatogrammi del campione e delle soluzioni di riferimento, acquisiti nelle stesse condizioni cromatografiche. Misurare le aree di ciascun picco nei cromatogrammi ottenuti e calcolare la concentrazione di ciascun composto organoalogenato tramite confronto con le rette di taratura.
Verificare giornalmente, utilizzando almeno due delle soluzioni di riferimento, che i risultati ottenuti siano entro la variabilità analitica definita al Paragrafo (9.2).
Tale metodo (riferimento esterno) presuppone la possibilità di introdurre quantità di campione molto esatte o comunque molto riproducibili (si presta pertanto all'uso di autocampionatori). In caso contrario è opportuno usare la tecnica del riferimento interno. In tal caso, addizionare alle soluzioni di riferimento e di controllo e ad ogni campione una soluzione di riferimento interno in concentrazione tale da avere un picco di area apprezzabile. È necessario un dosaggio del volume di riferimento interno estremamente riproducibile al fine di ottenere la medesima concentrazione in tutte le soluzioni.

Tab. 2 - Condizioni operative tipiche per l'analisi mediante spazio di testa dinamico

Temperatura iniziale trappola	Una temperatura bassa (meglio se <0°C, comunque non >25°C) garantisce una migliore possibilità di intrappolamento per gli analiti, soprattutto quelli più volatili
"Purge"	In questa fase il gas passa attraverso il campione, contenuto in apposita ampolla, e gorgoglia alcuni minuti trasferendo gli analiti alla trappola; tempo di gorgogliamento consigliato: 12 minuti; flusso 40 mL/min
"Dry purge"	Serve a rimuovere l'acqua o l'eventuale umidità dalla trappola. Durata: circa un minuto
"Desorb preheat"	È usato per riscaldare la trappola ad alta temperatura in modo che gli analiti vengano rilasciati dall'adsorbente: in questa fase non vi è flusso di gas; temperatura consigliata 230°C
Desorbimento	Gli analiti vengono desorbiti dalla trappola dal gas di trasporto e trasferiti al gascromatografo: in questa fase, della durata di circa 4 minuti, la temperatura consigliata è di 250°C
Pulizia	In questa fase, in cui il gas passa attraverso il sistema per rimuovere eventuali residui di analiti e tracce di umidità rimaste nel sistema, la trappola è portata ad alta temperatura (280°C o superiore) per un tempo di almeno 15 minuti. Dopo questa fase si ritorna alle condizioni di "stand by"
Trappola	Tenax oppure carbone o altri materiali adsorbenti o loro miscele
Gas di reazione	Idrogeno (30 mL/min)
Gas di "make up"	Elio (30 mL/min)
Flusso alcol n-propilico:	0,5 mL/min

Un esempio di cromatogrammma di una soluzione di riferimento (2 µg/L per ciascun analita) ottenuto con l'analisi mediante spazio di testa dinamico è riportato in Fig. 2.

8. Calcoli

8.1 Metodo di taratura diretta o con riferimento esterno

Costruire le rette di taratura per i singoli analiti, accertandosi di operare nel campo linearità

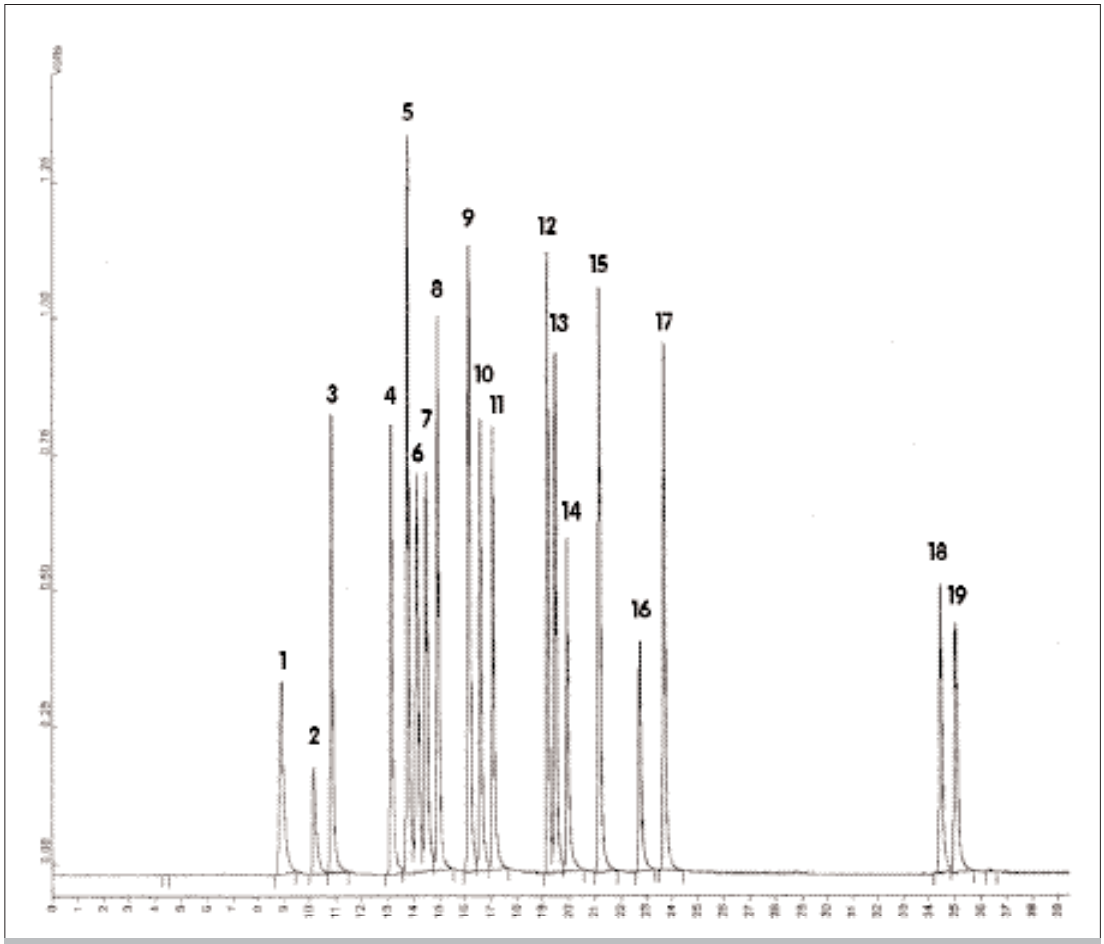


Figura 2: Gascromatogramma di una soluzione di taratura (2 µg/L per ciascun analita) analizzata con lo spazio di testa dinamico. Condizioni gascromatografiche. Precolonna di silice fusa senza fase, di pari diametro della colonna analitica; colonna gascromatografica=DB 624; lunghezza: 75 m, diametro interno (i.d.)=0,53 mm, spessore film = 3 µm; temperatura del rivelatore (ELCD): 250°C; gas di trasporto: elio o idrogeno puri per gascromatografia; Programma di temperatura - TEMP1: 37°C; TIME1: 8 minuti; RATE1: 10°C/min; TEMP2: 160°C; TIME2: 12 minuti; RATE2: 20°C/min; TEMP3: 200°C; TIME3: 5,7 minuti.
1=1,1-dicloroetilene; 2=diclorometano; 3=trans-1,2-dicloroetilene; 4=cis-1,2-dicloroetilene; 5=cloroformio; 6=1,1,1-tricloroetano; 7=tetracloruro di carbonio; 8=1,2-dicloroetano; 9=tricoloroetilene; 10=1,2-dicloropropano; 11=diclorobromometano; 12=1,1,2-tricloroetano; 13=tetracloroetilene; 14=clorodibromometano; 15=1,1,1,2-tetracloroetano; 16=bromoformio; 17=1,1,2,2-tetracloroetano; 18=1,2,4-triclorobenzene, 19=esaclorobutadiene.

dello strumento, riportando in grafico l'area del picco del composto (A) in funzione della concentrazione del composto stesso ed interpolando i punti sperimentali con il metodo dei minimi quadrati. Ricavare il coefficiente angolare (a) e l'intercetta (b) della retta di taratura.
La concentrazione incognita di ogni composto (C), espressa in µg/L, è data dalla relazione:

$$C = \frac{A - b}{a} \cdot \frac{V_f}{V_i}$$

dove:
C = concentrazione (mg/L) dell'analita;
A = area del picco dell'analita nella miscela incognita;
b = valore dell'intercetta della retta di taratura;
a = valore del coefficiente angolare della retta di taratura;
V_f = volume (mL) dell'estratto finale;
V_i = volume (mL) del campione acquoso.

8.2 Metodo con riferimento interno

Nel caso in cui si utilizzi il riferimento interno, riportare in grafico il rapporto area picco composto/area picco riferimento interno (A/A_{si}) in funzione della concentrazione del composto stesso. La concentrazione incognita di ogni composto, è data dalla relazione:

$$C = \frac{A/A_{si} - b}{a} \cdot \frac{V_f}{V_i}$$

dove:
C = concentrazione (µg/L) dell'analita;
A = area del picco dell'analita nella miscela incognita;
A_{si} = area del picco del riferimento interno nella miscela incognita;
b = valore dell'intercetta della retta di taratura;
a = valore del coefficiente angolare della retta di taratura;
V_f = volume (mL) dell'estratto finale;
V_i = volume (mL) del campione acquoso.

Accertarsi che la concentrazione del campione sia all'interno dell'intervallo di concentrazione utilizzato per la curva di taratura.

9. Qualità del dato

9.1 Spazio di testa statico

Prove effettuate da quattro laboratori su 5 repliche di soluzioni di acqua deionizzata contenenti 10 µg/L di ciascun analita hanno fornito valori del coefficiente di variazione, CV(%) = (scarto tipo/valore medio)·100, compresi tra 2,2% e 10% e recuperi tra il 98% e il 102%. Va tenuto presente che la precisione e l'accuratezza di un metodo generalmente peggiorano all'aumentare della complessità della matrice.

9.2 Spazio di testa dinamico

Prove effettuate da tre laboratori su 5 repliche di soluzioni di acqua deionizzata contenenti 2 µg/L di ciascun analita hanno fornito valori del coefficiente di variazione compresi tra 2,4% e 14,6% e recuperi tra l'86% e il 107%. Su soluzioni sintetiche contenenti 10 µg/L il coefficiente di variazione era compreso tra 1,1% e 5,6% e il recupero tra l'84% e il 109%. Va tenuto presente che la precisione e l'accuratezza di un metodo generalmente peggiorano all'aumentare della complessità della matrice.

Nota: *si consiglia ai laboratori di attivare, in accordo con le norme internazionali più recenti, dei programmi di controllo formale sulla qualità dei dati prodotti. Ciò si può realizzare verificando le proprie prestazioni attraverso analisi effettuate, ad intervalli regolari di tempo, su materiali di riferimento certificati prodotti da organismi internazionali e su materiali di riferimento non certificati (carte di controllo). Informazioni sul tipo di materiali certificati e sugli organismi che li producono sono fornite nella Sezione 1040 "Qualità del dato analitico".*
Il materiale di riferimento non certificato va caratterizzato in termini di valore medio ed incertezza ad esso associata, rispetto al quale si verificano gli scostamenti di misure giornaliere condotte in parallelo con l'insieme dei campioni incogniti da determinare.

APPENDICE

A) Spazio di testa statico
Il sistema analitico può essere adattato alla contemporanea determinazione dei"solventi aromatici". Si può utilizzare un gascromatografo bicolonna, oppure operare una scelta accurata di un'unica colonna di fase opportuna (ad esempio 94% metilpolisilossano e 6% cianopropilfenilpolisilossano), un doppio rivelatore di cui uno selettivo per le sostanze alogenate (ECD) ed uno universale (FID) e un sistema di elaborazione dati in grado di acquisire i dati da due rivelatori contemporaneamente. Nel caso si utilizzino due colonne, gli analiti in ingresso all'iniettore verranno ripartiti, dopo la precolonna e tramite "press-fit", alle due diverse colonne cromatografiche collegate ai due diversi rivelatori. In questo caso si ricorrerà all'iniezione di un volume maggiore di campione.
Nel caso si utilizzi una sola colonna, il rivelatore FID verrà montato in parallelo all'ECD: un partitore di flusso all'uscita della colonna cromatografica, suddividerà il flusso tra i due rivelatori permettendo di analizzare anche campioni contenenti quantità elevate di composti clorurati o di confermare sostanze per le quali il tempo di ritenzione non sia l'elemento univoco di riconoscimento.

B) Spazio di testa dinamico

Utilizzando una colonna di lunghezza superiore alle normali capillari impiegate per spazio di testa statico, e cioè da 75 m, e due rivelatori in parallelo, il rivelatore a fotoionizzazione PID e l'ELCD, si può fare riferimento a metodiche in grado di determinare contemporaneamente fino a 60 composti, tra idrocarburi aromatici e alogenoderivati.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard methods for the examination of water and wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA).

U.S.EPA. (1991): "*Volatile organic compounds in water by purge and trap capillary column gas cromatography with photoionization and electrolitic conductivity detectors in series*". Method 502.2 in "*Methods for the determination of organic compounds in finishing drinking water and raw source water*". U.S. Environmental Protection Agency, Environmental Monitoring and Support Lab., Cincinnati, Ohio.

5160. Sostanze oleose (Grassi e oli animali e vegetali; idrocarburi totali)

Introduzione

La presenza di oli e grassi animali e vegetali è rilevante negli effluenti dell'industria alimentare (caseifici, mattatoi, oleifici, frantoi) e nei liquami di origine civile. Idrocarburi di origine petrolifera si ritrovano negli scarichi di industrie petrolifere e petrolchimiche in concentrazioni più o meno significative a seconda della tipologia del processo produttivo e dell'età degli impianti. La loro presenza nei corpi idrici è legata per lo più a sversamenti accidentali.
Nella determinazione delle sostanze oleose totali, degli idrocarburi totali e dei grassi e oli animali e vegetali non viene misurata la quantità assoluta di una sostanza specifica, bensì quella di un gruppo di sostanze le cui caratteristiche di solubilità in un determinato solvente organico sono simili.
Durante il procedimento di estrazione con solvente passano nella fase organica idrocarburi, acidi grassi, trigliceridi, tensioattivi, oli e ogni altro composto estraibile con il solvente nelle condizioni stabilite nel metodo. Da questa precisazione deriva che le definizioni di "sostanze oleose totali", "oli e grassi animali e vegetali" e "idrocarburi totali" dipendono dal metodo di analisi impiegato.
Quando bisogna distinguere tra oli e grassi animali e vegetali e idrocarburi totali è necessario operare nel modo seguente:

- effettuare la determinazione quantitativa delle sostanze oleose totali;
- effettuare la determinazione quantitativa degli idrocarburi totali;
- fare la differenza tra le rispettive concentrazioni di sostanze oleose totali e di idrocarburi totali.

Il valore ottenuto rappresenta la concentrazione di oli e grassi animali e vegetali.
Vengono proposti due metodi, uno gravimetrico per acque fortemente inquinate (Metodo A) ed uno spettrofotometrico all'infrarosso (Metodo B) per basse concentrazioni. Il solvente organico utilizzato per l'estrazione è rappresentato da una miscela di n-esano (80%) e metil-tert-butiletere (20%) nel caso della determinazione gravimetrica, mentre per il metodo all'infrarosso è indispensabile disporre di solventi che non assorbano nella regione di interesse. Composti come tetracloroetilene, tetracloruro di carbonio e 1,1,2-triclorotrifluoroetano rispondono al suddetto requisito ma il loro impiego costituisce un rischio a livello sanitario e/o ambientale. Nel presente metodo si è scelto di ricorrere all'1,1,2-triclorotrifluoroetano in accordo con quanto previsto da altre metodologie validate (Standard Methods, ASTM). Tuttavia in letteratura esistono altri metodi normati quali ad esempio il metodo ISO 9377-2 (2000), basato sull'impiego della gascromatografia.
Rispetto al metodo gravimetrico, la procedura all'infrarosso non prevedendo alcuna evaporazione dell'estratto consente di determinare eventuali idrocarburi volatili presenti nel campione.

METODO A – Determinazione gravimetrica

METODO A1 – Sostanze oleose totali

1. Principio del metodo

Il campione in esame viene acidificato ed estratto con una miscela di n-esano (80%) e metil-tert-butiletere (20%). L'estratto, raccolto in un recipiente ed evaporato, fornisce un residuo che viene determinato per via gravimetrica.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ad acque naturali, di scarico e di mare per concentrazioni in sostanze oleose superiori a 10 mg/L.

3. Interferenze e cause di errore

Durante il procedimento di estrazione le sostanze si ripartiscono tra le due fasi in ragione del proprio coefficiente di ripartizione tra la miscela di solventi (6.6) e l'acqua, da cui può derivare una sottostima. La doppia estrazione serve a migliorare il recupero.
La rimozione del solvente comporta la perdita per evaporazione delle sostanze più leggere; la perdita che subiscono in questa operazione i distillati del petrolio, dalla benzina al gasolio, dipende dalla loro volatilità.
Alcuni oli greggi e combustibili pesanti contengono una percentuale apprezzabile di costituenti di natura bituminosa e polimerica che sono poco solubili nella miscela di solventi (6.6); il loro recupero è di conseguenza incompleto.
L'impossibilità, in molti casi, di conoscere "a priori" la composizione della miscela oleosa presente nel campione e, quindi, la necessità di utilizzare come soluzione di riferimento una miscela diversa da quella del campione costituisce la più rilevante causa di errori nella determinazione in oggetto.
Un graduale aumento di peso osservato durante la fase di evaporazione dell'estratto, se si opera in assenza di essiccatore, rappresenta una tipica causa di errore; l'incompleta eliminazione dell'acqua dall'estratto organico comporta, dopo essiccamento, la comparsa di cristalli di sodio solfato e quindi una sovrastima di sostanze oleose nel campione. Tale interferenza può essere rimossa sciogliendo nuovamente l'estratto nel solvente di estrazione e procedendo all'allontanamento del solfato di sodio per filtrazione.
Per ridurre il rischio di contaminazione dei campioni è consigliato l'uso di attrezzature in vetro con giunti normalizzati e smerigliati. È da escludere l'uso di lubrificanti.
La vetreria da laboratorio impiegata deve essere riservata specificatamente per questo tipo di indagine. Va lavata con detersivo, sciacquata con acqua deionizzata, asciugata in stufa e trattata, prima dell'uso, con la miscela di solventi (6.6).

4. Campionamento e conservazione del campione

Una particolare attenzione richiede la tecnica di prelievo di campioni di acqua, a causa del fatto che le sostanze oleose si presentano nei corpi idrici sotto forma di film superficiale o di goccioline.
Dal punto di vista pratico un prelievo omogeneo può essere effettuato:

- con la stessa bottiglia di raccolta nel caso di scarichi effettuati per caduta da apposite tubazioni;

- con l'uso di un dispositivo capace di raccogliere una sezione trasversale completa dello scarico.

I campioni vanno raccolti in bottiglie di vetro pulite, a collo e tappo smerigliato, lavate con la miscela di solventi (6.6) e asciugate prima dell'uso. Le bottiglie di raccolta non vanno riempite fino all'orlo, per evitare, durante il loro trasporto, perdite di composti oleosi stratificati in superficie. Allo scopo di inibire eventuali attività batteriche, il campione prelevato va subito portato a pH=2 con acido cloridrico diluito 1:1 e analizzato il più presto possibile, conservandolo, nel frattempo, a 4°C.

5. Apparecchiature

5.1 Normale attrezzatura di laboratorio

5.2 Bottiglia in vetro da campionamento a collo largo, da 200-3000 mL circa, con tappo smerigliato oppure con tappo a vite con guarnizione di tenuta in teflon.

5.3 Imbuti separatori da 500 mL a 3000 mL, muniti di rubinetto in teflon. In alternativa è possibile utilizzare bottiglie di campionamento in vetro dello stesso volume con chiusura a vite, tappo con guarnizione di tenuta in teflon, dotate di rubinetto in teflon per consentire l'estrazione degli analiti direttamente nella bottiglia.

5.4 Pallone da distillazione codato a fondo piatto da 300 mL con raccordo per l'inserimento del condensatore Liebig (5.8).

5.5 Capsule di porcellana o beaker di vetro (di peso non superiore a 70 g) da circa 100 mL.

5.6 Bagno termostatico ad acqua

5.7 Stufa a convezione naturale

5.8 Condensatore tipo Liebig, lungo 300 mm, con giunto sferico normalizzato 24/29 con raccordo al recipiente di raccolta del distillato (in alternativa qualunque dispositivo utilizzabile per la raccolta del solvente).

5.9 Imbuto filtrante a setto poroso

6. Reattivi

6.1 Acido cloridrico (d=1,19), diluito 1:1 (v/v).

6.2 n-Esano

6.3 Metil-tert-butiletere

6.4 Cloruro di sodio, solido.

6.5 Sodio solfato anidro (Na_2SO_4) per analisi, trattato a 400°C per 4 ore; conservare in essiccatore.

6.6 Miscela di solventi

Preparare la miscela ponendo in un recipiente 80 volumi di n-esano (6.2) e 20 volumi di metil-tert-butiletere (6.3).

7. Procedimento

7.1 Estrazione

Il procedimento descritto è relativo a volumi di campione di 2 L circa. È consigliabile in tal caso usare una bottiglia marcata al segno di 2 litri. Trasferire quantitativamente il campione in un imbuto separatore da 3000 mL, procedere all'aggiunta di 5 mL/L di HCl 1:1 (6.1), se non è stata già effettuata all'atto del campionamento. Controllare che il pH sia ≤2, in caso contrario aggiungere altro HCl 1:1. Aggiungere 10 g di cloruro di sodio (6.4) e versare nell'imbuto 100 mL della miscela di solventi (6.6) dopo aver lavato con la stessa la bottiglia che aveva contenuto il campione, computando la quantità eventualmente già impiegata per il lavaggio del dispositivo di campionamento. Agitare vigorosamente l'imbuto separatore per 2 minuti oppure per 20 minuti mediante agitazione meccanica. Dopo qualche secondo di agitazione è opportuno aprire il rubinetto allo scopo di ridurre la pressione. Imprimere un movimento rotatorio al liquido contenuto nell'imbuto separatore per favorire la separazione delle due fasi. Dopo aver separato le due fasi, filtrare l'estratto organico attraverso un imbuto filtrante contenente circa 3 g di solfato di sodio anidro (6.5) uniformemente distribuito sul setto e raccogliere l'estratto organico nel recipiente 5.4. L'utilizzo di un filtro GF/F, da porre sul setto dell'imbuto filtrante, consente di minimizzare il passaggio di sali nell'estratto organico e di evitare una sovrastima del contenuto di sostanze oleose nell'estratto.
Versare altri 100 mL di miscela (6.6), estrarre nuovamente come descritto sopra e raccogliere l'estratto organico nel pallone di distillazione (5.4). Lavare il solfato di sodio con 2 aliquote di miscela (6.6) (15 mL per volta) e raccogliere l'eluato nel recipiente 5.4.

7.2 Evaporazione e pesata

Distillare cautamente l'estratto impiegando l'apparecchiatura di distillazione di cui ai punti 5.4 e 5.8, su bagno termostatico, concentrando fino a circa 10 mL.
Versare la soluzione residua nel recipiente 5.5 (*) (pulito, condizionato per 60 minuti in stufa a 55°C, lasciato raffreddare per 30 minuti in essiccatore e pesato), risciacquare poi il pallone con una modesta quantità di miscela (6.6) e recuperare i lavaggi nel medesimo recipiente 5.5.
Portare quasi a secchezza il contenuto del recipiente 5.5, esponendolo ai vapori del bagno termostatico mantenuto a circa 80°C.
Tenere quindi il recipiente 5.5 in stufa a 55°C per 60 minuti.
Lasciare raffreddare in essiccatore per 30 minuti e quindi pesare.

8. Calcoli

Calcolare la concentrazione delle sostanze oleose totali, espressa in mg/L, nel modo seguente:

$$C = \frac{A - B}{V}$$

dove:
C = concentrazione di sostanze oleose totali (mg/L);
A = peso (mg) del residuo nel recipiente (5.5), estratto dal campione;
B = peso (mg) dell'eventuale residuo rimasto dopo una prova in bianco, condotta su 230 mL di miscela (6.6), procedimento descritto al Paragrafo (7.2);
V = volume (L) di campione.

(*) A causa della notevole delicatezza dell'analisi i beaker o le capsule non devono essere mai toccati direttamente con le mani, ma soltanto con apposite pinze di acciaio inossidabile e devono essere appoggiate su superfici perfettamente pulite (ad esempio vetri da orologio).

9. Qualità del dato

Prove effettuate da quattro laboratori su soluzioni di acqua deionizzata contenenti 20 mg/L di sostanze oleose hanno fornito uno scarto tipo di 2,59 mg/L per il singolo operatore e 3,67 mg/L come riproducibilità.

METODO A2 – Idrocarburi totali

1. Principio del metodo

Il campione in esame viene acidificato ed estratto con una miscela di n-esano (80%) e metil-tert-butiletere (20%). L'estratto viene percolato attraverso una colonna riempita di gel di silice, per eliminare le sostanze polari eventualmente presenti, raccolto in un recipiente ed evaporato. Il residuo viene determinato per via gravimetrica.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ad acque naturali, di scarico e di mare per concentrazioni in idrocarburi totali superiori a 10 mg/L.

3. Interferenze e cause di errore

Durante il procedimento di estrazione le sostanze si ripartiscono tra le due fasi in ragione del proprio coefficiente di ripartizione tra la miscela di solventi (6.6) e l'acqua, da cui può derivare una sottostima. La doppia estrazione serve a migliorare il recupero.
La rimozione del solvente comporta la perdita per evaporazione delle sostanze più leggere; la perdita che subiscono in questa operazione i distillati del petrolio, dalla benzina al gasolio, dipende dalla loro volatilità.
Alcuni oli greggi e combustibili pesanti contengono una percentuale apprezzabile di costituenti di natura bituminosa e polimerica che sono poco solubili nella miscela di solventi (6.6); il loro recupero è di conseguenza incompleto.
L'impossibilità, in molti casi, di conoscere "a priori" la composizione della miscela oleosa presente nel campione e, quindi, la necessità di utilizzare come soluzione di riferimento una miscela diversa da quella del campione costituisce la più rilevante causa di errori nella determinazione in oggetto.
Un graduale aumento di peso osservato durante la fase di evaporazione dell'estratto, se si opera in assenza di essiccatore, rappresenta una tipica causa di errore; l'incompleta eliminazione dell'acqua dall'estratto organico comporta, dopo essiccamento, la comparsa di cristalli di sodio solfato e quindi una sovrastima di sostanze oleose nel campione. Tale interferenza può essere rimossa sciogliendo nuovamente l'estratto nel solvente di estrazione e procedendo all'allontanamento del solfato di sodio per filtrazione.
Per ridurre il rischio di contaminazione dei campioni è consigliato l'uso di attrezzature in vetro con giunti normalizzati e smerigliati. È da escludere l'uso di lubrificanti.
La vetreria da laboratorio impiegata deve essere riservata specificatamente per questo tipo di indagine. Va lavata con detersivo, sciacquata con acqua deionizzata, asciugata in stufa e trattata, prima dell'uso, con la miscela di solventi (6.6).

4. Campionamento e conservazione del campione

Una particolare attenzione richiede la tecnica di prelievo di campioni di acqua, a causa del fatto che le sostanze oleose si presentano nei corpi idrici sotto forma di film superficiale o di goccioline.
Dal punto di vista pratico un prelievo omogeneo può essere effettuato:

- con la stessa bottiglia di raccolta nel caso di scarichi effettuati per caduta da apposite tubazioni;
- con l'uso di un dispositivo capace di raccogliere una sezione trasversale completa dello scarico.

I campioni vanno raccolti in bottiglie di vetro pulite, a collo e tappo smerigliato, lavate con la miscela di solventi (6.6) e asciugate prima dell'uso. Le bottiglie di raccolta non vanno riempite fino all'orlo, per evitare, durante il loro trasporto, perdite di idrocarburi stratificati in superficie.
Allo scopo di inibire eventuali attività batteriche, il campione prelevato va subito portato a pH=2 con acido cloridrico diluito 1:1 e analizzato il più presto possibile, conservandolo, nel frattempo, a 4°C.

5. Apparecchiature

5.1 Normale attrezzatura di laboratorio

5.2 Bottiglia in vetro da campionamento a collo largo, da 200-3000 mL circa, con tappo smerigliato oppure con tappo a vite con guarnizione di tenuta in teflon.

5.3 Imbuti separatori da 3000 mL, muniti di rubinetto in teflon. In alternativa è possibile utilizzare bottiglie di campionamento in vetro dello stesso volume con chiusura a vite, tappo con guarnizione di tenuta in teflon, dotate di rubinetto in teflon per consentire l'estrazione degli analiti direttamente nella bottiglia.

5.4 Pallone da distillazione codato a fondo piatto da 300 mL con adatto raccordo per l'inserimento del condensatore Liebig (5.8).

5.5 Capsule di porcellana o beaker di vetro (di peso non superiore a 70 g) da circa 100 mL.

5.6 Bagno termostatico ad acqua

5.7 Stufa a convezione naturale

5.8 Condensatore tipo Liebig, lungo 300 mm, con giunto sferico normalizzato 24/29 con opportuno raccordo al recipiente di raccolta del distillato (in alternativa qualunque dispositivo utilizzabile per la raccolta del solvente).

5.9 Colonna di percolazione in vetro, d.i. 10 mm, con rubinetto in teflon.

6. Reattivi

6.1 Acido cloridrico (d=1,19), diluito 1:1 (v/v).

6.2 n-Esano

6.3 Metil-tert-butiletere

6.4 Cloruro di sodio, solido.

6.5 Sodio solfato anidro (Na_2SO_4) p.a., trattato a 400°C per 4 ore; conservare in essiccatore.

6.6 Miscela di solventi

Preparare la miscela ponendo in un recipiente 80 volumi di n-esano (6.2) e 20 volumi di metil-tert-butiletere (6.3).

6.7 Gel di silice 70-230 mesh per cromatografia su colonna.

7. Procedimento

7.1 Estrazione

Il procedimento descritto è relativo a volumi di campione pari a 2 litri circa. È consigliabile in tal caso usare una bottiglia marcata al segno di 2 litri. Trasferire quantitativamente il campione in un imbuto separatore da 3000 mL, procedere all'aggiunta di 5 mL/L di HCl 1:1 (6.1), se non è stata già effettuata all'atto del campionamento. Controllare che il pH sia ≤2, in caso contrario aggiungere altro HCl 1:1. Aggiungere 10 g di cloruro di sodio (6.4) e versare nell'imbuto 100 mL della miscela di solventi (6.6) dopo aver lavato con la stessa la bottiglia che aveva contenuto il campione, computando la quantità eventualmente già impiegata per il lavaggio del dispositivo di campionamento. Agitare vigorosamente l'imbuto separatore per 2 minuti oppure per 20 minuti mediante agitazione meccanica. Dopo qualche secondo di agitazione è opportuno aprire il rubinetto allo scopo di ridurre la pressione. Imprimere un movimento rotatorio al liquido contenuto nell'imbuto separatore per favorire la separazione delle due fasi. Lasciar separare le due fasi e far percolare la fase organica attraverso una colonnina di vetro, munita di rubinetto in teflon e riempita con uno strato (5 cm di altezza) di gel di silice (6.6) seguito da uno strato di 3 g di Na_2SO_4 (6.5). La fase organica, dopo aver attraversato la colonna, viene raccolta nel pallone di distillazione 5.4.
Ripetere l'estrazione e la percolazione su gel di silice con altri 100 mL di miscela (6.6), quindi la fase organica viene raccolta nel pallone di distillazione 5.4.
Lavare due volte la colonnina, facendo passare 15 mL alla volta di miscela (6.6) e raccogliere la fase organica nel recipiente 5.4.

7.2 Evaporazione e pesata

Distillare cautamente l'estratto impiegando l'apparecchiatura di distillazione di cui ai Paragragi (5.4) e (5.8), su bagno termostatico, concentrando fino a circa 10 mL.
Versare la soluzione residua nel recipiente 5.5 (*) (pulito, condizionato per 60 minuti in stufa a 55°C, lasciato raffreddare per 30 minuti in essiccatore e pesato), risciacquare poi il pallone con modesta quantità di miscela (6.6) e recuperare i lavaggi nel medesimo recipiente 5.5.
Portare quasi a secchezza il contenuto del recipiente 5.5, esponendolo ai vapori del bagno termostatico mantenuto a circa 80°C.
Tenere quindi il recipiente 5.5 in stufa a 55°C per 60 minuti.
Lasciare raffreddare in essiccatore per 30 minuti e quindi pesare.

(*) A causa della notevole delicatezza dell'analisi i beaker o le capsule non devono essere mai toccati direttamente con le mani, ma soltanto con apposite pinze di acciaio inossidabile e devono essere appoggiate su superfici perfettamente pulite (ad esempio vetri da orologio).

8. Calcoli

Calcolare la concentrazione degli idrocarburi totali, espressa in mg/L, nel modo seguente:

$$C = \frac{A - B}{V}$$

dove:
C = concentrazione (mg/L) di idrocarburi totali;
A = peso (mg) del residuo nel recipiente (5.5), estratto dal campione;
B = peso (mg) dell'eventuale residuo rimasto dopo una prova in bianco, condotta su 230 mL di miscela (6.6), procedimento descritto al Paragrafo (7.2);
V = volume (L) di campione.

9. Qualità del dato

Prove effettuate da quattro laboratori su soluzioni di acqua deionizzata contenenti 20 mg/L di idrocarburi hanno fornito uno scarto tipo di 3,09 mg/L per il singolo operatore e 4,07 mg/L come riproducibilità.

METODO B – Determinazione mediante spettrofotometria infrarossa

METODO B1 – Sostanze oleose totali

1. Principio del metodo

Il metodo si basa sulla determinazione delle sostanze oleose totali mediante spettrofotometria di assorbimento all'infrarosso (IR). Il campione di acqua, preventivamente acidificato, viene estratto con 1,1,2-triclorotrifluoroetano. Dalla misura dell'area nella regione compresa tra 3015 e 2800 cm^{-1} si ricava la concentrazione delle sostanze oleose totali mediante confronto con una curva di taratura ottenuta con soluzioni di riferimento (esadecano, iso-ottano) a concentrazioni note comprese nel campo di indagine analitico.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ad acque di scarico, superficiali e di mare per concentrazioni di sostanze oleose totali superiori a 0,05 mg/L. Tale limite può essere ulteriormente abbassato a 0,01 mg/L se si dispone di un'apparecchiatura FT-IR, e se si utilizzano celle di più elevato cammino ottico (>1 cm).

3. Interferenze e cause di errore

Durante il procedimento di estrazione le sostanze si ripartiscono tra le due fasi in ragione del proprio coefficiente di ripartizione tra 1,1,2-triclorotrifluoroetano e acqua. La doppia estrazione serve a migliorare il recupero.
Alcuni oli greggi e combustibili pesanti contengono una percentuale apprezzabile di costituenti di natura bituminosa e polimerica che sono poco solubili in 1,1,2-triclorotrifluoroetano; il loro recupero è di conseguenza incompleto.
L'impossibilità, in molti casi, di conoscere "a priori" la composizione della miscela oleosa pre-

sente nel campione e, quindi, la necessità di utilizzare come soluzione di riferimento una miscela diversa da quella del campione costituisce la più rilevante causa di errori nella determinazione in oggetto.
Per ridurre il rischio di contaminazione dei campioni è consigliato l'uso di attrezzature in vetro con giunti normalizzati e smerigliati. È da escludere l'uso di lubrificanti.
La vetreria da laboratorio impiegata deve essere riservata specificatamente per questo tipo di indagine. Va lavata con detersivo, sciacquata con acqua deionizzata, asciugata in stufa e trattata, prima dell'uso, con 1,1,2-triclorotrifluoroetano.

4. Campionamento e conservazione del campione

Una particolare attenzione richiede la tecnica di prelievo di campioni di acqua, a causa del fatto che le sostanze oleose si presentano nei corpi idrici sotto forma di film superficiale o di goccioline.
Dal punto di vista pratico un prelievo omogeneo può essere effettuato:

- con la stessa bottiglia di raccolta nel caso di scarichi effettuati per caduta da apposite tubazioni;
- con l'uso di un dispositivo capace di raccogliere una sezione trasversale completa dello scarico.

I campioni vanno raccolti in bottiglie di vetro pulite, a collo e tappo smerigliato, lavate con 1,1,2-triclorotrifluoroetano e asciugate prima dell'uso. Le bottiglie di raccolta non vanno riempite fino all'orlo, per evitare, durante il loro trasporto, perdite di composti oleosi stratificati in superficie.
Allo scopo di inibire eventuali attività batteriche, il campione prelevato va subito portato a pH=2 con acido cloridrico diluito 1:1 (v/v) e analizzato il più presto possibile, conservandolo, nel frattempo, a 4°C.

5. Apparecchiature

5.1 Normale attrezzatura di laboratorio

5.2 Bottiglia di campionamento in vetro a collo largo, da 500-3000 mL circa, con tappo smerigliato oppure con tappo a vite con guarnizione in teflon.

5.3 Imbuti separatori di volume adeguato, muniti di rubinetto e tappo in teflon. In alternativa è possibile utilizzare bottiglie di campionamento in vetro con chiusura a vite, tappo con guarnizione di tenuta in teflon.

5.4 Spettrofotometro FT-IR o IR, doppio raggio, munito di celle in quarzo con cammino ottico di 1 cm e di 4 cm.

5.5 Imbuto filtrante a setto poroso, capacità 50 mL.

5.6 Bilancia analitica

5.7 Bilancia tecnica

6. Reattivi

6.1 Acido cloridrico (d=1,19), diluito 1:1 (v/v).

6.2 1,1,2-triclorotrifluoroetano "per Spettroscopia".

6.3 n-Esadecano per analisi

6.4 Iso-ottano per analisi

6.5 Sodio solfato anidro (Na_2SO_4) p.a., trattato a 400°C per 4 ore; conservare in essiccatore.

6.6 Soluzione di riferimento di idrocarburi

Preparare la soluzione di riferimento costituita da n-esadecano (50% in volume) e iso-ottano (50% in volume) trasferendo 10 mL di n-esadecano e 10 mL di iso-ottano in un flacone da 25 mL. Tappare con ghiera di alluminio e sottotappo in teflon. Tale miscela conservata a 4°C è stabile sei mesi.

6.7 Soluzione concentrata di idrocarburi (1 mg/mL)

Pesare 100 mg ± 1mg di miscela (6.6) in matraccio tarato da 100 mL e portare a volume con 1,1,2-triclorotrifluoroetano. La soluzione conservata a 4°C è stabile tre mesi.

6.8 Soluzioni diluite

Prelevare volumi della soluzione concentrata di idrocarburi (6.7) esattamente noti (esempio 0,5 mL; 1 mL; 5 mL) e portare a volume in matraccio tarato da 50 mL. In un altro matraccio da 50 mL, che fungerà da bianco, aggiungere 50 mL di 1,1,2-triclorotrifluoroetano. Tali soluzioni vanno preparate giornalmente.

7. Procedimento

7.1 Ottimizzazione delle condizioni strumentali

Lo spettrofotometro IR (o FT-IR) rimane normalmente acceso anche nel caso di prolungata inattività. Prima di avviare il ciclo di misure, procedere all'ottimizzazione dei parametri strumentali seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento o in altri protocolli di riferimento.

7.2 Taratura

Quando la natura dell'inquinante è nota, è auspicabile impiegare per la taratura lo stesso composto, preparando soluzione diluite in 1,1,2-triclorotrifluoroetano. Tuttavia, poichè nella maggior parte dei casi la natura della miscela di idrocarburi presente nel campione non è nota, si ricorre ad una miscela di riferimento. Per molti anni si è utilizzata come soluzione di riferimento una miscela di esadecano (37,5%), iso-ottano (37,5%) e benzene (25%). Tuttavia, la maggiore attenzione prestata in questi ultimi anni alle problematiche concernenti la salute degli operatori addetti al controllo, in particolar modo in presenza di sostanze, come il benzene, di accertata cancerogenicità, suggerisce di eliminare, in accordo con quanto previsto dal metodo ASTM, il benzene dalla suddetta miscela. Tale eliminazione ha, peraltro, scarsa rilevanza sul piano della qualità del dato ottenuto in quanto i diversi protocolli standardizzati prevedono la misura dell'assorbanza in una regione dello spettro IR in cui il benzene non fornisce alcun contributo (come altezza di picco a 2930 cm^{-1} o come area integrata nell'intervallo 3015-2800 cm^{-1}).
Alla luce delle considerazioni esposte si suggerisce l'impiego della soluzione di riferimento (6.6). Registrare lo spettro IR delle soluzioni diluite (6.8) nella regione compresa tra 3200 cm^{-1} e 2700 cm^{-1}, utilizzando il 1,1,2-triclorotrifluoroetano (6.2) come riferimento. Misurare l'integrale dell'area sottesa dai picchi compresi nella regione 3015-2800 cm^{-1}.

7.3 Trattamento del campione

7.3.1 Estrazione

Trasferire un quantitativo noto del campione in esame, compreso tra 0,5 L e 2,0 L, in adatto imbuto separatore e procedere all'aggiunta di 5 mL di HCl 1:1 (6.1), se non è stata già effettuata all'atto del campionamento. Controllare che il pH sia ≤2, in caso contrario aggiungere altro HCl 1:1.
Aggiungere, operando sotto cappa, 20 mL di 1,1,2-triclorotrifluoroetano con cui si è lavata la bottiglia di raccolta del campione e, qualora sia stata usato, il contenitore in vetro dell'apposito dispositivo di campionamento. Agitare vigorosamente l'imbuto separatore per 2 minuti oppure per 20 minuti mediante agitazione meccanica. Lasciare separare le due fasi, filtrare l'estratto organico attraverso un imbuto filtrante contenente circa 3 g di solfato di sodio anidro (6.5) uniformemente distribuito sul setto e raccogliere l'estratto organico in un pallone tarato da 50 mL. Ripetere l'estrazione con altri 20 mL di 1,1,2-triclorotrifluoroetano e unire l'estratto a quello precedente. Portare a volume a 50 mL.

7.4 Analisi

Effettuare uno spettro preliminare per rendersi conto dell'ordine di grandezza del valore di area da misurare.
Registrare lo spettro IR della soluzione ottenuta dall'estrazione del campione seguendo le modalità già indicate per le soluzioni diluite (6.8).
Misurare l'area sottesa dai picchi compresi nella regione 3015-2800 cm^{-1}.

8. Calcoli

La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le quantità (in mg) delle soluzioni taratura in ascissa e le unità di area corrispondenti in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se la deviazione standard della retta stimata è inferiore al 5%.
La concentrazione di sostanze oleose totali viene ricavata dalla seguente formula:

$$C = \frac{A \cdot f}{V}$$

dove:
C = concentrazione (mg/L) di sostanze oleose totali;
A = quantità (mg) ricavata utilizzando l'equazione della retta di regressione;
f = fattore di diluizione (eventuale) dell'estratto;
V = volume (L) di campione.

9. Qualità del dato

Prove effettuate da cinque laboratori su campioni di acque di scarico contenenti 2 mg/L di sostanze oleose hanno fornito uno scarto tipo pari a 0,21 mg/L per il singolo operatore e 0,22 mg/L come riproducibilità.

METODO B2 - Idrocarburi totali

1. Principio del metodo

Il metodo si basa sulla determinazione degli idrocarburi totali mediante spettrofotometria di assorbimento all'infrarosso (IR). Il campione di acqua, preventivamente acidificato, viene estratto con 1,1,2-triclorotrifluoroetano; la fase organica viene fatta percolare attraverso una colonna di gel di silice per eliminare le sostanze polari coestratte. Dalla misura dell'area nella regione compresa tra 3015 cm^{-1} e 2800 cm^{-1} si ricava la concentrazione degli idrocarburi totali mediante confronto con una curva di taratura ottenuta con soluzioni di riferimento (esadecano, iso-ottano) a concentrazioni note comprese nel campo di indagine analitico.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ad acque di scarico, superficiali e di mare per concentrazioni di idrocarburi totali superiori a 0,05 mg/L. Tale limite può essere ulteriormente abbassato a 0,01 mg/L se si dispone di un'apparecchiatura FT-IR e se si utilizzano celle di più elevato cammino ottico (>1 cm).

3 Interferenze e cause di errore

Durante il procedimento di estrazione gli idrocarburi si ripartiscono tra le due fasi in ragione del proprio coefficiente di ripartizione tra 1,1,2-triclorotrifluoroetano e acqua. La doppia estrazione serve a migliorare il recupero.
Alcuni oli greggi e combustibili pesanti contengono una percentuale apprezzabile di costituenti di natura bituminosa e polimerica che sono poco solubili in 1,1,2-triclorotrifluoroetano; il loro recupero è di conseguenza incompleto.
L'impossibilità, in molti casi, di conoscere "a priori" la composizione della miscela oleosa presente nel campione e, quindi, la necessità di utilizzare come soluzione di riferimento una miscela diversa da quella del campione costituisce la più rilevante causa di errori nella determinazione in oggetto.
Per ridurre il rischio di contaminazione dei campioni è consigliato l'uso di attrezzature in vetro con giunti normalizzati e smerigliati. È da escludere l'uso di lubrificanti.
La vetreria da laboratorio impiegata deve essere riservata specificatamente per questo tipo di indagine. Va lavata con detersivo, sciacquata con acqua deionizzata, asciugata in stufa e trattata, prima dell'uso, con 1,1,2-triclorotrifluoroetano.
La purificazione degli estratti su colonne di gel di silice può essere causa di errori sia positivi che negativi dovuti, nel primo caso, al rilascio di sostanze organiche adsorbite sul substrato e, nel secondo caso, ad incompleta eluizione degli idrocarburi. Per evitare questi inconvenienti si deve controllare la purezza del gel di silice e verificare il recupero degli idrocarburi eluiti dalla colonna.

4. Campionamento e conservazione del campione

Una particolare attenzione richiede la tecnica di prelievo di campioni di acqua, a causa del fatto che le sostanze oleose si presentano nei corpi idrici sotto forma di film superficiale o di goccioline. Dal punto di vista pratico un prelievo omogeneo può essere effettuato:

- con la stessa bottiglia di raccolta nel caso di scarichi effettuati per caduta da apposite tubazioni;
- con l'uso di un dispositivo capace di raccogliere una sezione trasversale completa dello scarico.

I campioni vanno raccolti in bottiglie di vetro pulite, a collo e tappo smerigliato, lavate con 1,1,2-triclorotrifluoroetano e asciugate prima dell'uso. Le bottiglie di raccolta non vanno riempite fino all'orlo, per evitare, durante il loro trasporto, perdite di idrocarburi stratificati in superficie.
Allo scopo di inibire eventuali attività batteriche, il campione prelevato va subito portato a pH=2 con acido cloridrico diluito 1:1 e analizzato il più presto possibile, conservandolo, nel frattempo, a 4°C.

5. Apparecchiature

5.1 Normale attrezzatura di laboratorio

5.2 Bottiglia di campionamento in vetro a collo largo, da 500-3000 mL circa, con tappo smerigliato oppure con tappo a vite con guarnizione in teflon.

5.3 Imbuti separatori di volume adeguato, muniti di rubinetto e tappo in teflon. In alternativa è possibile utilizzare bottiglie di campionamento in vetro dello stesso volume con chiusura a vite, tappo con guarnizione di tenuta in teflon.

5.4 Spettrofotometro FT-IR o IR, doppio raggio, munito di celle in quarzo con cammino ottico di 1 cm e di 4 cm.

5.5 Colonnine di percolazione in vetro, d.i. 10 mm, con rubinetto in teflon.

5.6 Bilancia analitica

5.7 Bilancia tecnica

6. Reattivi

6.1 Acido cloridrico (d=1,19), diluito 1:1 (v/v).

6.2 1,1,2-triclorotrifluoroetano "per Spettroscopia".

6.3 n-Esadecano per analisi

6.4 Iso-ottano per analisi

6.5 Sodio solfato anidro (Na_2SO_4) *per analisi*, trattato a 400°C per 4 ore; conservare in essiccatore.

6.6 Gel di silice 70-230 mesh per cromatografia su colonna.

6.7 Soluzione di riferimento di idrocarburi

Preparare la soluzione di riferimento costituita da n-esadecano (50% in volume) e iso-ottano (50% in volume) trasferendo 10 mL di n-esadecano e 10 mL di iso-ottano in un flacone da 25 mL. Tappare con ghiera di alluminio e sottotappo in teflon. Tale miscela conservata a 4°C è stabile sei mesi.

6.8 Soluzione concentrata di idrocarburi (1 mg/mL)

Pesare 100 mg ± 1 mg di miscela (6.7) in matraccio tarato da 100 mL e portare a volume con 1,1,2-triclorotrifluoroetano. La soluzione conservata a 4°C è stabile tre mesi.

6.9 Soluzioni diluite

Prelevare volumi della soluzione concentrata di idrocarburi (6.8) esattamente noti (esempio 0,5 mL; 1 mL; 5 mL) e portare a volume in matraccio tarato da 50 mL. In un altro matraccio da 50 mL, che fungerà da bianco, aggiungere 50 mL di 1,1,2-triclorofluoroetano. Tali soluzioni vanno preparate giornalmente.

7. Procedimento

7.1 Ottimizzazione delle condizioni strumentali

Lo spettrofotometro IR (o FT-IR) rimane normalmente acceso anche nel caso di prolungata inattività. Prima di avviare il ciclo di misure, procedere all'ottimizzazione dei parametri strumentali seguendo le indicazioni riportate nel manuale d'uso dello strumento o in altri protocolli di riferimento.

7.2 Taratura

Quando la natura dell'inquinante è nota, è auspicabile impiegare per la taratura lo stesso composto, preparando soluzioni diluite in 1,1,2-triclorotrifluoroetano. Tuttavia, poichè nella maggior parte dei casi la natura della miscela di idrocarburi presente nel campione non è nota, si ricorre ad una miscela di riferimento. Per molti anni si è utilizzata come soluzione di riferimento una miscela di esadecano (37,5%), iso-ottano (37,5%) e benzene (25%). Tuttavia, la maggiore attenzione prestata in questi ultimi anni alle problematiche concernenti la salute degli operatori addetti al controllo, in particolar modo in presenza di sostanze, come il benzene, di accertata cancerogenicità, suggerisce di eliminare, in accordo con quanto previsto dal metodo ASTM, il benzene dalla suddetta miscela. Tale eliminazione ha, peraltro, scarsa rilevanza sul piano della qualità del dato ottenuto in quanto i diversi protocolli di riferimento prevedono la misura dell'assorbanza in una regione dello spettro IR in cui il benzene non fornisce alcun contributo (come altezza di picco a 2930 cm^{-1} o come area integrata nell'intervallo 3015-2800 cm^{-1}).
Alla luce delle considerazioni esposte si suggerisce l'impiego della soluzione di riferimento (6.7).
Registrare lo spettro IR delle soluzioni diluite (6.9) nella regione compresa tra 3200 cm^{-1} e 2700 cm^{-1} utilizzando il 1,1,2-triclorotrifluoroetano (6.2) come riferimento. Misurare l'integrale dell'area sottesa dai picchi compresi nella regione 3015-2800 cm^{-1}.

7.3 Trattamento del campione

7.3.1 Estrazione

Trasferire un quantitativo noto del campione in esame, compreso tra 0,5 L e 2,0 L, in adatto imbuto separatore e procedere all'aggiunta di 5 mL di HCl 1:1 (6.1), se non è stata già effettuata all'atto del campionamento. Controllare che il pH sia ≤2, in caso contrario aggiungere altro HCl 1:1.
Aggiungere, operando sotto cappa, 20 mL di 1,1,2-triclorotrifluoroetano con cui si è lavata la bottiglia di raccolta del campione e, qualora sia stata usato, il contenitore in vetro dell'apposito dispositivo di campionamento. Agitare vigorosamente l'imbuto separatore per 2 minuti oppure per 20 minuti mediante agitazione meccanica. Lasciare separare le due fasi e far percolare la fase organica attraverso una colonnina di vetro, munita di rubinetto in teflon e riempita con 0,5 g di gel di silice (6.6) e 0,3 g di Na_2SO_4 (6.5) disposti su strati sovrapposti. La colonnina va preventivamente lavata con 1,1,2-triclorotrifluoroetano e l'eluato analizzato all'IR per controllare l'assenza di bande idrocarburiche nell'intervallo spettrale di interesse analitico. Generalmente sono sufficienti per il lavaggio 15 mL. Raccogliere il percolato in un matraccio tarato da 50 mL, avendo cura di scartare i primi 2 mL circa. Ripetere l'estrazione

con altri 20 mL di 1,1,2-triclorotrifluoroetano; l'estratto, assieme alle tracce di emulsione eventualmente presenti, viene percolato attraverso la colonnina e raccolto nello stesso matraccio precedente. Portare a volume a 50 mL.

7.4 Analisi

Effettuare uno spettro preliminare per rendersi conto dell'ordine di grandezza del valore di area da misurare.
Registrare lo spettro IR della soluzione ottenuta dall'estrazione del campione seguendo le modalità già indicate per le soluzioni diluite (6.9).
Misurare l'area sottesa dai picchi compresi nella regione 3015-2800 cm^{-1}.

8. Calcoli

La retta di taratura si ottiene tramite il calcolo della regressione lineare, con le quantità (in mg) delle soluzioni diluite (6.9) in ascissa e le unità di area corrispondenti in ordinata. La regressione può essere considerata accettabile ai fini analitici se lo scarto tipo della retta stimata è inferiore al 5%.
La concentrazione di idrocarburi totali viene ricavata dalla seguente formula:

$$C = \frac{A \cdot f}{V}$$

dove:
C = concentrazione (mg/L) di idrocarburi totali;
A = quantità (mg) ricavata utilizzando l'equazione della retta di regressione;
f = fattore di diluizione (eventuale) dell'estratto;
V = volume (L) di campione.

9. Qualità del dato

Su campioni di acqua di scarico il valor medio dei recuperi di aggiunte di soluzioni di riferimento di idrocarburi nell'intervallo di concentrazione compreso tra 1 mg/L e 5 mg/L è risultato del 98%.
Una serie di misure (n=5) effettuate su campioni di acque naturali a concentrazione di 0,30 mg/L ha fornito un coefficiente di variazione del 7%.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the examination of water and wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA).

ASTM (1996): "*Standard test method for oil and grease and petroleum hydrocarbons in water*", D 3921, 355-360, (Philadelphia).

CARLBERG S.R. & SKARSTEDT C.B. (1972): "Determination of small amounts of non-polar hydrocarbons (oil) in sea weater", *J. Cons. Int. Explor. Mer*, **34**, 506-515.

EPA (1979): "*Manual of methods for chemical analysis of water and wastes*", Cincinnati, Environmental Research Center.

EPA (1994): "*Total recoverable petroleum hydrocarbons by infrared spectrofotometry*", Method 418.1, Cincinnati.

IRSA (1984): "Oli minerali. Determinazione spettrofotometrica IR", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **59**, 402.2.

SIMARD R.G., RASEGAWA I., BANDARUK W. & HEADINGTON C.E. (1951): "Infrared spectrophotometric determination of oil and phenols in water", *Anal. Chem.*, **23**, 1384-1387.

UNICHIM (1995a): "*Manuale 177/7. Linee guida per la taratura della strumentazione analitica – Spettrometria a dispersione nella regione dell'infrarosso*".

UNICHIM (1995b): "Manuale 177/8. *Linee guida per la taratura della strumentazione analitica – Spettrometria a trasformata di Fourier nella regione dell'infrarosso*".

ISO 9377-2: (2000): *"Water quality - Determination of hydrocarbon oil index - Part 2. Method using solvent extraction and gas chromatography"*.

5170. Tensioattivi anionici

Introduzione

I tensioattivi anionici sono costituenti fondamentali dei formulati impiegati nella detergenza domestica ed industriale. La loro presenza in acque superficiali e sotterranee è sempre indice di inquinamento antropico.
Con il termine di tensioattivi anionici si intende l'insieme delle molecole organiche caratterizzate dalla presenza di una componente idrofobica (catena idrocarburica lineare o ramificata) e di una idrofila carica negativamente (anione solfonato o solfato).

1. Principio del metodo

I tensioattivi anionici formano con il blu di metilene (colorante cationico) un sale di colore blu che viene estratto quantitativamente in cloroformio. L'assorbanza della fase cloroformica è proporzionale alla concentrazione del tensioattivo anionico e viene misurata, per via spettrofotometrica, alla lunghezza d'onda di 650 nm.

2. Campo di applicazione

Il metodo determina globalmente i tensioattivi anionici solfonati e solfatati (MBAS)(*) presenti in acque di scarico urbane ed industriali e in acque superficiali e sotterranee.
Il metodo è applicabile nell'intervallo di concentrazione 0,025-100 mg/L di tensioattivi espressi come MBAS. L'utilizzo di celle con cammino ottico di 5 cm consente di rilevare concentrazioni fino a 0,005 mg/L.

3. Interferenze e cause di errore

Interferenze positive vengono date da sostanze organiche che danno luogo a sali con il blu di metilene, estraibili in cloroformio (solfati, solfonati e carbossilati organici, ecc.), o da sostanze inorganiche che danno luogo con il blu di metilene a coppie ioniche (cianati, fluoruri, cloruri, nitrati, tiocianati, ecc.).
Interferenze negative vengono date da sostanze che, reagendo con i tensioattivi anionici, impediscono la formazione del sale con il blu di metilene (ammine, sali di ammonio quaternario, ecc.)
Effettuando l'estrazione del sale colorato, com'è indicato nel seguito, dapprima mediante una soluzione alcalina di blu di metilene seguita da un trattamento con una soluzione acida dello stesso reattivo, dette interferenze (positive e negative) vengono notevolmente ridotte.
Altre interferenze negative possono essere date da specie capaci di ridurre il blu di metilene; nel caso di presenza di solfuri si deve procedere alla loro ossidazione con acqua ossigenata in ambiente alcalino (**).

(*) MBAS (Methylene Blue Active Substances): sostanze attive al blu di metilene.
(**) Se occorre, neutralizzare il campione prelevato secondo (7.3) ed aggiungere 10 mL di soluzione tampone (6.3) e alcune gocce di acqua ossigenata (6.9). Lasciare a riposo per 5 minuti e procedere come indicato in (7.1) a partire dal secondo comma. Ovviamente si eviterà di aggiungere altra soluzione tampone. Per alte concentrazioni di solfuri trovare sperimentalmente le condizioni operative più adatte.

Infine si è riscontrato che altre sostanze organiche, non tensioattive, possono dare interferenze positive a seguito di formazione di sali con il blu di metilene, sali estraibili in cloroformio. Soluzioni di sostanze di questo tipo, alle concentrazioni riportate in Tab. 1, addizionate con 1 mg/L di alchilbenzensolfonato (LAS), hanno dato i seguenti valori come MBAS:

Tabella 1: Interferenze positive date da sostanze organiche non tensioattive

Sostanze organiche interferenti	Concentrazioni (mg/L)	Valore trovato come MBAS (interferenti org.+LAS) in mg/L
Acido picrico	5,0	4,6
Acido naftalensolfonico	5,0	5,1
Acido 2-antrachinonsolfonico	1,0	1,7
Acido 1-antrachinonsolfonico	5,0	1,2
Acido 2-idrossi-1-naftalensolfonico	1,0	1,4

In caso di presenza accertata delle sostanze elencate in Tab. 1, per la loro eliminazione è necessario ricorrere alla tecnica di pre-estrazione, basata sull'insufflazione di azoto, descritta nella Sezione 5180 "Tensioattivi non ionici".

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".
Il campione deve essere stabilizzato con l'1% (v/v) di formaldeide al 37% e conservato a 4°C allo scopo di ridurre al minimo l'attività batterica. L'analisi deve essere condotta preferibilmente entro le 24 ore successive al prelievo.

5. Apparecchiatura

5.1 Normale apparecchiatura da laboratorio

5.2 Spettrofotometro, predisposto per misure nell'intorno di 650 nm e corredato di celle da 1 cm e 5 cm.

Tutta la vetreria impiegata nel presente metodo deve essere accuratamente lavata con acqua, risciacquata con una soluzione metanolica di acido cloridrico 3 M (6.10) e quindi con acqua distillata e deionizzata.

6. Reattivi

Tutti i reattivi devono essere puri per analisi e l'acqua utilizzata deve essere distillata e/o deionizzata.

6.1 Soluzione concentrata di MBAS (1000 mg/L)

Sciogliere 1000 mg del sale sodico dell'acido dodecilbenzensolfonico in 1000 mL di acqua.

6.2 Soluzione diluita di MBAS (50 mg/L)

Prelevare esattamente 5 mL della soluzione concentrata di MBAS (6.1), trasferirli in un matraccio tarato da 100 mL e portare a volume con acqua.

6.3 Soluzione tampone a pH 10

Sciogliere 24 g di idrogeno carbonato di sodio ($NaHCO_3$) e 27 g di carbonato di sodio anidro (Na_2CO_3) in acqua e diluire a 1000 mL.

6.4 Soluzione neutra di blu di metilene

Sciogliere 0,35 g di blu di metilene in 500 mL di acqua e diluire a 1000 mL. L'assorbanza della fase cloroformica della prova in bianco, misurata contro cloroformio, non deve superare 0,015 impiegando una cella con cammino ottico di 1 cm a 650 nm.
Questa soluzione va preparata almeno 24 ore prima dell'uso. Inoltre i volumi da utilizzare nel presente metodo devono essere sempre preestratti con cloroformio.

6.5 Acido solforico concentrato (H_2SO_4) (d=1,84)

6.6 Soluzione acida di blu di metilene

Sciogliere 0,35 g di blu di metilene in 500 mL di acqua, aggiungere 6,5 mL di acido solforico concentrato (6.5) e diluire a 1000 mL con acqua. Anche in questo caso, l'assorbanza della fase cloroformica della prova in bianco deve rispondere alla condizione indicata al punto 6.4. Inoltre la soluzione, preparata almeno 24 ore prima dell'uso, deve essere pre-estratta con cloroformio.

6.7 Etanolo (C_2H_5OH) al 95%

6.8 Cloroformio ($CHCl_3$), di recente distillazione.

6.9 Soluzione di acqua ossigenata (H_2O_2) al 30%

6.10 Soluzione 3 M di acido cloridrico in metanolo

Diluire 250 mL di acido cloridrico concentrato (HCl, d=1,19) in 750 mL di metanolo.

7. Procedimento

7.1 Curva di taratura per concentrazioni di MBAS comprese tra 0,05 e 0,5 mg/L

Prelevare esattamente 0,1 mL, 0,2 mL, 0,4 mL, 0,8 mL e 1 mL della soluzione diluita di MBAS (6.2) ed introdurli in imbuti separatori (da 250 mL) contenenti 100 mL di acqua.
Aggiungere in ciascun imbuto separatore 10 mL di soluzione tampone a pH 10 (6.3), 5 mL di soluzione neutra al blu di metilene (6.4) e 15 mL di cloroformio (6.8).
Agitare uniformemente e non troppo energicamente la miscela per un minuto. Lasciare stratificare e trasferire lo strato cloroformico inferiore in una seconda serie di imbuti separatori da 250 mL, contenenti 110 mL di acqua e 5 mL di soluzione acida di blu di metilene (6.6).
Agitare la miscela per un minuto, lasciate stratificare e trasferire le rispettive fasi cloroformiche, dopo averle fatte passare attraverso filtri di ovatta idrofila previamente trattati con etanolo (6.7) ed inumiditi con cloroformio, in matracci tarati da 50 mL.
Estrarre rispettivamente le soluzioni alcaline ed acide ancora due volte utilizzando 10 mL di cloroformio (6.8) alla volta, per la seconda e la terza estrazione. Filtrare gli estratti cloroformici attraverso gli stessi filtri di ovatta idrofila nei rispettivi matracci da 50 mL. Questi ultimi vanno portati a volume con il cloroformio utilizzato per il lavaggio dei filtri di ovatta idrofila.
Miscelare bene e misurare l'assorbanza a 650 nm in celle con cammino ottico di 5 cm, contro il bianco ottenuto sottoponendo 100 mL di acqua deionizzata all'intera procedura descritta. Costruire la curva di taratura riportando in ascissa i µg di dodecilbenzensolfonato e in ordinata i corrispondenti valori di assorbanza.

7.2 Curva di taratura per concentrazioni di MBAS comprese tra 0,5 e 4 mg/L

Prelevare esattamente 1 mL, 2 mL, 4 mL, 6 mL, 8 mL della soluzione diluita di MBAS (6.2) ed introdurli in imbuti separatori (da 250 mL) contenenti rispettivamente 99 mL, 98 mL, 96 mL, 94 mL e 92 mL di acqua. Procedere come indicato al Paragrafo (7.1) a partire dal secondo comma. Utilizzare in questo caso per le misure di assorbanza celle con cammino ottico di 1 cm.

7.3 Determinazione

Prelevare una determinata quantità di campione, se necessario neutralizzarla ed introdurla in un imbuto separatore da 250 mL per prelievi fino a 100 mL e da 500 mL per prelievi fino a 400 mL, seguendo orientativamente le indicazioni riportare in Tab. 2. Se il campione da analizzare è inferiore a 100 mL, diluire a 100 mL con acqua.
Procedere alla determinazione dell'MBAS operando come indicato al Paragrafo (7.1), a partire dal secondo comma. Nel caso in cui il campione contenga quantità di solidi sospesi tali da creare problemi durante il processo di estrazione, si consiglia di procedere alla filtrazione del campione (sotto vuoto o in pressione) con filtri in fibra di vetro da 0,80 µm. Possono essere necessari più filtri se la quantità di solidi sospesi è tale da creare intasamento. Lavare i filtri utilizzati per la filtrazione con 10 mL di metanolo ciascuno ed aggiungere il metanolo raccolto al campione (in questo caso si dovrà tenere conto della diluizione del campione iniziale). Effettuare sempre parallelamente una determinazione del bianco con la procedura completa.

8. Calcoli

Dal valore dell'assorbanza del campione analizzato, ricavare mediante la curva di taratura la quantità in µg di tensioattivi anionici (MBAS) presenti nel campione. La concentrazione di tensioattivi anionici sarà data dalla seguente formula:

$$C = \frac{a}{V}$$

dove:
C = concentrazione (mg/L) di tensioattivi anionici MBAS (come dodecibelbenzenesolfonato di sodio)
a = quantità (µg) di tensioattivi anionici, come MBAS, ricavati dalla curva di taratura;
V = volume (mL) di campione prelevato per l'analisi.

Tabella 2: Indicazione orientativa dei volumi di campione da analizzare in funzione del presunto contenuto di tensioattivi anionici

Contenuto presunto di tensioattivo anionico (mg/L)	Volume di campione da prelevare (mL)
0,025-0,075	400
0,075-0,50	250
0,50-1,50	100
1,50-7,50	20
7,50-50,0	2

9. Qualità del dato

Determinazioni eseguite in quintuplicato da sei laboratori su campioni filtrati di acque di scarico (influente ed effluente di un impianto di depurazione) hanno mostrato coefficienti di variazione, CV(%) = (scarto tipo/valore medio)·100, rispettivamente del 7% e 9%.

Per soluzioni sintetiche contenenti intorno a 0,3 mg/L di LAS, il recupero è risultato pari a circa il 111%.

BIBLIOGRAFIA

CEE (1982): "*Determinazione dei tensioattivi anionici nelle prove di biodegradabilità*", in: Direttiva del Consiglio 82/243/CEE del 31 marzo 1982, Cap. 3, *Gazz. Uff. delle Comunità Europee*, L. 109.

ISO (1984): "*Determination of anionic surfactants*", ISO 7875/1, 1st edition.

LONGWELL J. & MANIECE W.P. (1955): "Determination of Anionic Detergent in Sewage Effluent and River Water", *Analyst*, **80**, 176-171.

MATTHIJS E. & DE HENAU, H. (1987): "Determination of linear alkylbenzene sulphonates in aqueous samples sediments, sludges and soils using HPLC, *Tenside Detergents,* **24**, (4), 193-198.

MINISTRY OF HOUSING AND LOCAL GOVERNMENT (1966): "*Supplement to the Eight Progress Report of the Standing Technical Committee on Synthetic Detergents*", Appendix III, Method B (London, Her Majesty's Stationery Office).

WATERS J. & GARRIGAN J.T. (1983): "An improved microdesulphonation/gas liquid chromatography procedure for the determination of linear alkylbenzene sulphonates in U.K. rivers", *Wat. Res.*, **17**, 1549-l562.

5180. Tensioattivi non ionici

Introduzione

I tensioattivi non ionici sono costituenti fondamentali dei formulati impiegati nella detergenza domestica ed industriale. La loro presenza in acque superficiali e sotterranee è sempre indice di inquinamento antropico.
Con il termine di tensioattivi non ionici si intende l'insieme delle molecole organiche caratterizzate dalla presenza di una componente idrofobica (catena idrocarburica lineare o ramificata) e di una idrofila non carica (gruppo etossilato etereo, estereo o ammidico).

1. Principio del metodo

I tensioattivi non ionici formano con il reattivo di Dragendorff ($KBiI_4$ + $BaCl_2$ in acido acetico glaciale) un precipitato nel quale il rapporto di combinazione Bi-tensioattivo è circa 1:1. Il precipitato viene disciolto e il bismuto presente viene titolato per via potenziometrica con pirrolidinditiocarbammato di sodio (NaPDC) che lo complessa nel rapporto 3:1 (3 NaPDC:1 Bi).

2. Campo di applicazione

Questo metodo permette la determinazione dei tensioattivi non ionici etossilati (BIAS)* contenenti da 6 a 30 gruppi ossietilenici, in acque di scarico e naturali nell'intervallo di concentrazione compreso tra 0,05 mg/L e 0,50 mg/L.
L'estensione del campo di applicazione del metodo alle basse concentrazioni (0,01-0,05 mg/L) è possibile pur comportando una diminuzione della precisione del metodo stesso.

3. Interferenze e cause di errore

Nelle condizioni del metodo i tensioattivi cationici interferiscono positivamente poichè danno luogo alla formazione di un precipitato con lo iodobismutato di bario. Il ricorso a saggi di ricerca qualitativa (es. blu di disulfine) non è sempre sufficiente ad accertare la loro presenza in campioni ambientali in quanto la contemporanea presenza di tensioattivi anionici può mascherarli.
L'interferenza di tensioattivi anionici è stata verificata in campioni di effluenti da impianti di trattamento biologico caratterizzati da concentrazioni elevate (≥1 mg/L) di tensioattivi anionici.
Sulla base delle considerazioni esposte, è assolutamente indispensabile nel caso di campioni di acqua di scarico procedere alla purificazione dell'estratto su resina cationica. In questi stessi campioni anche il passaggio su resina anionica diventa importante qualora siano presenti in quantità apprezzabili interferenze anioniche.
In campioni di acque superficiali a concentrazioni di BIAS comprese tra 0,01 mg/L e 0,05 mg/L, la variazione di BIAS ottenuta dopo passaggio su resine è paragonabile allo scarto tipo dei valori stessi. Nel contempo le procedure di purificazione rendono il metodo più laborioso e possono determinare una diminuzione della qualità del dato. In questo caso è opzionale procedere alla purificazione dell'estratto.

* Sostanze attive allo iodio-bismutato

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento e la conservazione del campione devono essere effettuati in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento".
Il campione deve essere stabilizzato con l'1% (v/v) di formaldeide al 37% e conservato a 4°C allo scopo di ridurre al minimo l'attività batterica. L'analisi deve essere condotta preferibilmente entro le 24 ore successive al prelievo.

5. Apparecchiature

5.1 Normale vetreria di laboratorio

5.2 Apparecchio di estrazione (sublatore) in vetro da 1000 mL (Fig. 1).

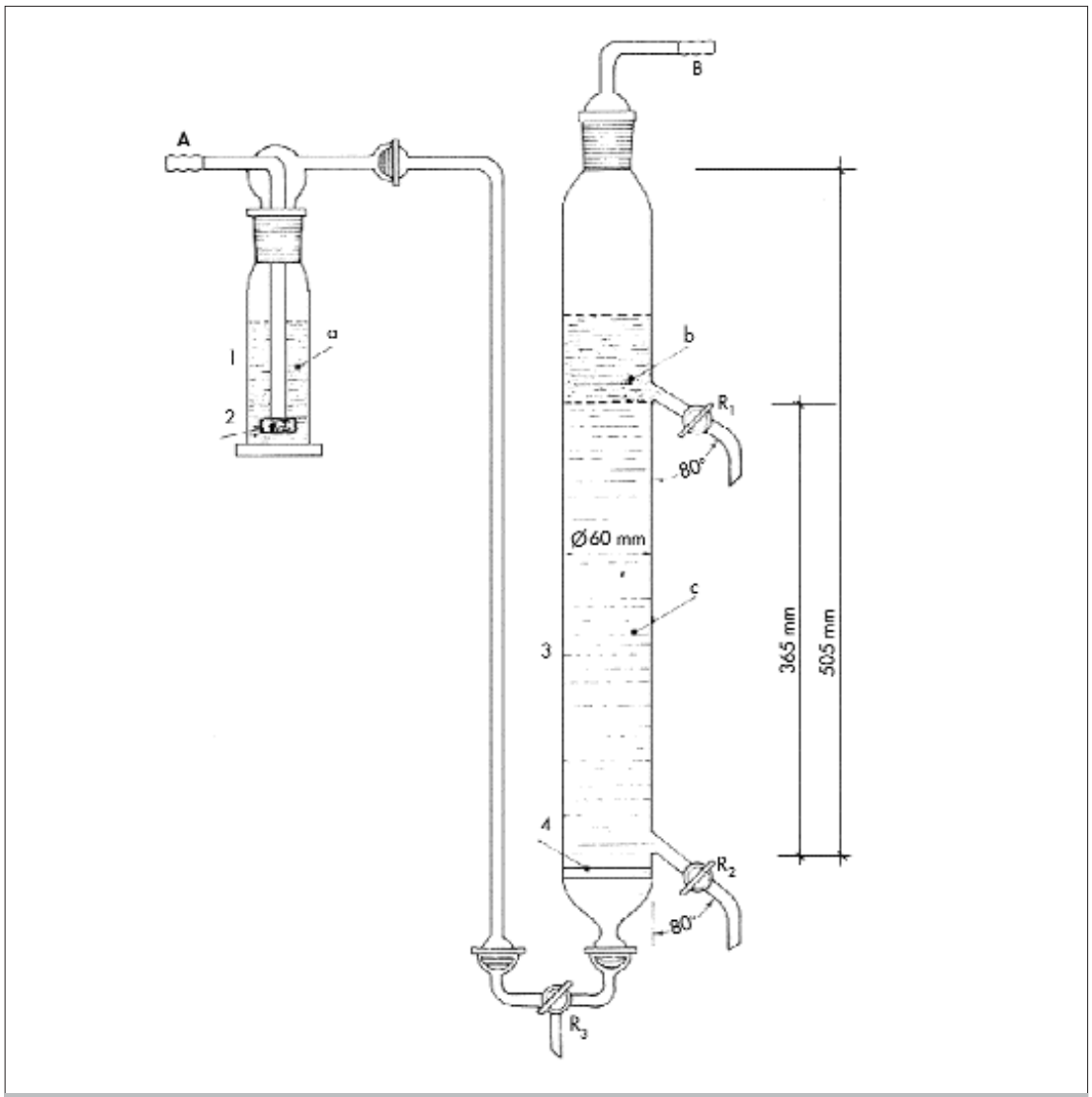


Figura 1: Apparecchio di estrazione per tensioattivi (1: Bottiglia di lavaggio; 2: Setto poroso; 3: Colonna di strippaggio; 4: Setto di vetro sinterizzato; a e b: Acetato di etile; c: campione in esame (soluzione acquosa); A: Ingresso azoto; B: Uscita azoto; R: Rubinetti).

5.3 Colonne a scambio ionico in vetro (d=10 mm; h=150 mm), provviste di setto poroso in vetro sinterizzato, rubinetto di teflon nella parte inferiore, serbatoio (capacità 80 mL) e tappo smerigliato nella parte superiore.

5.4 Buretta da 25 mL graduata in 0,05 mL.

5.5 Buretta da 5 mL graduata in 0,01 mL.

5.6 Crogiolo filtrante in vetro, diametro 47 mm, porosità 3÷15 µm.

5.7 Titolatore potenziometrico con sensibilità di 1 mV, munito di elettrodi di platino e di calomelano.

5.8 Agitatore elettrico regolabile ad alta velocità.

Nota 1: *in alternativa a 5.4 e 5.5 si può utilizzare un dosatore automatico. In alternativa a 5.4, 5.5, 5.7 e 5.8 si può utilizzare un titolatore automatico.*

Nota 2: *tutta la vetreria deve essere scrupolosamente pulita ed accuratamente risciacquata con acqua distillata e deionizzata. Metanolo ed acetato di etile possono essere impiegati per lavare vetreria e sublatori tra un'analisi e l'altra. Per evitare più lunghe e laboriose operazioni di pulizia è consigliabile disporre di sublatori, colonne a scambio ionico e, in generale, di vetreria dedicata ai diversi tipi di campioni da analizzare (bianco, acqua di scarico, acqua superficiale).*

6. Reattivi

Tutte le soluzioni devono essere preparate impiegando acqua distillata o deionizzata.

6.1 Idrogeno carbonato di sodio

6.2 Cloruro di sodio

6.3 Acetato di etile

6.4 Metanolo

6.5 Soluzione metanolica di porpora bromocresolo (1 g/L)

6.6 Soluzione acquosa di acido cloridrico (d=1,19) all'1% (v/v)

6.7 Soluzione A

Sciogliere 1,7 g di nitrato basico di bismuto [$4BiNO_3(OH)_2 \cdot BiO(OH)$] in 20 mL di acido acetico glaciale e portare a 100 mL con acqua. Sciogliere 65 g di ioduro di potassio in 200 mL di acqua e travasarli, unitamente alla prima soluzione, in un matraccio tarato da 1000 mL. Aggiungere 200 mL di acido acetico glaciale e portare a volume con acqua. Preparare questo reattivo settimanalmente e conservarlo in bottiglia di vetro scuro.

6.8 Soluzione B

Introdurre 290 g di cloruro di bario ($BaC1_2 \cdot 2H_2O$) in un matraccio tarato da 1000 mL, sciogliere con acqua e portare a volume.

6.9 Reattivo di precipitazione formato da due volumi di soluzione A e un volume di soluzione B.

6.10 Acido acetico glaciale

6.11 Soluzione di tartrato di ammonio

Introdurre 20 g di tartrato di ammonio in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua.

6.12 Soluzione di ammoniaca al 16%

6.13 Soluzione tampone

Porre 40 g di idrossido di sodio in un matraccio tarato da 1000 mL, aggiungere 500 mL di acqua fino a completa dissoluzione, 120 mL di acido acetico glaciale e, dopo raffreddamento, portare a volume con acqua.

6.14 Alcool amilico

6.15 Soluzione 0,0005 N di NaPDC

Porre 103 mg di NaPDC e 0,5 g di idrogeno carbonato di sodio, 10 mL di alcool amilico in un matraccio tarato da 1000 mL e portare a volume con acqua. Controllare il fattore (f) della soluzione settimanalmente utilizzando la soluzione di solfato di rame 0,0005 N.

6.16 Soluzione acquosa di acido solforico 1 M

6.17 Soluzione 0,0005 N di solfato di rame

Pesare 1,249 g di solfato di rame ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$), aggiungere 50 mL di acido solforico 1 M e portare a volume in un matraccio tarato da 1000 mL con acqua. Travasare 50 mL di questa soluzione in un matraccio tarato da 1000 mL, aggiungere 10 mL di acido solforico 1 M e portare a volume con acqua.

6.18 Resina a scambio cationico (Amberlite IR-120 Plus o equivalente).

6.19 Resina a scambio anionico (Amberlite IRA-910 o equivalente).

6.20 Soluzione metanolica di HCl 0,1 M

6.21 Soluzione metanolica di NaOH 0,1 M

7. Procedimento

7.1 Estrazione dei tensioattivi

Effettuare l'estrazione su un'aliquota di campione contenente da 0,05 mg/L a 0,5 mg/L di tensioattivo non ionico etossilato espresso come BIAS, utilizzando il sublatore (5.2) descritto in Fig. 1.
Qualora il contenuto di solidi sospesi nel campione da sottoporre a sublazione sia tale da compromettere un efficiente funzionamento (attraverso l'occlusione dei pori del setto del sublatore) o da richiedere una successiva laboriosa operazione di pulizia del sublatore, si consiglia la preventiva rimozione dei solidi sospesi mediante filtrazione sotto vuoto su filtri (0,80 μm) in fibra di vetro prelavati con metanolo. I tensioattivi adsorbiti sul materiale sospeso vengono recuperati lavando il filtro stesso con 10 mL di metanolo, che si aggiungono all'acqua filtrata.
Aggiungere ad un litro di campione, o a un volume inferiore portato ad un litro con acqua, 100 g di cloruro di sodio e 5 g di idrogeno carbonato di sodio. Trasferire quindi il campio-

ne nel sublatore aggiustandone eventualmente il volume con acqua fino al livello del rubinetto superiore di scarico R_1.
Introdurre successivamente 100 mL di acetato di etile e procedere alla sublazione con un flusso di azoto fatto preliminarmente passare in una bottiglia di lavaggio contenente acetato di etile.
Regolare il flusso dell'azoto ad una portata di 30-40 L/h, innalzando gradualmente il flusso fino a raggiungere il massimo consentito dalla condizione di non turbolenza all'interfaccia tra i due fluidi. Protrarre la sublazione per dieci minuti.
Lasciar separare le due fasi e recuperare quindi la fase organica da R_1 trasferendola in un imbuto separatore da 250 mL. Ripetere l'estrazione con 100 mL di acetato di etile operando come precedentemente indicato e trasferire la fase organica nello stesso imbuto separatore da 250 mL.
Se durante il processo di estrazione la fase organica diminuisce di oltre il 20%, l'operazione deve essere ripetuta. Lavare con una spruzzetta adibita allo scopo la parte superiore del sublatore con 25 mL di acetato di etile ed unirli alle frazioni precedentemente raccolte. Dopo aver scaricato la fase acquosa che nel frattempo si è separata, porre la fase organica in un pallone da 250 mL ed evaporarla mediate evaporatore rotante (T=35°C).

7.2 Preparazione del bianco

Riempire un secondo sublatore riservato al bianco fino al livello del rubinetto superiore con acqua deionizzata preventivamente addizionata di NaCl e $NaHCO_3$ in quantità pari a quelle usate per il campione. Procedere alla sublazione secondo le modalità già indicate per il campione. Sottoporre il residuo ottenuto dalla rotoevaporazione a tutte le fasi previste dalla procedura per l'analisi del campione.

7.3 Eliminazione dei tensioattivi cationici e anionici

7.3.1 Utilizzare le colonne a scambio ionico (5.3). Sono necessarie due colonne per ciascuna apparecchiatura di estrazione. Per preparare la colonna di scambio cationico trasferire circa 7 g di resina cationica forte (6.18) in 50 mL di metanolo e versare la sospensione in colonna in modo da trasferirvi quantitativamente la resina. Far defluire il solvente senza far andare a secco la resina, quindi attivarla attraverso la percolazione di 20 mL di una soluzione metanolica di HCl (6.20) e successivo lavaggio con metanolo, fino a pH neutro (verificato con cartina indicatore universale).
Per preparare la colonna di scambio anionico, utilizzare la resina a scambio anionico forte (6.19), seguendo le indicazioni sopra riportate per la colonna a scambio cationico. Attivare la colonna con 20 mL di soluzione metanolica di NaOH (6.21) e successivo lavaggio con metanolo fino a pH neutro. Mantenere sempre le colonne in metanolo.

7.3.2 Purificazione dell'estratto. Far scorrere sulle pareti interne del pallone 20 mL di metanolo e favorire la ridissoluzione del residuo sul fondo del pallone mediante vigorosa agitazione manuale o su piano oscillante, o immersione in bagno ad ultrasuoni per dieci minuti.
Percolare il residuo goccia a goccia dapprima sulla resina cationica e poi su quella anionica. Lavare quindi le due colonne con 60 mL di metanolo preventivamente utilizzati per il risciacquo del pallone contenente l'estratto ed unire la soluzione di lavaggio a quella del campione.
Si consiglia di riservare una colonna cationica ed una anionica esclusivamente alla purificazione del bianco. Rigenerare le colonne dopo ogni uso seguendo le modalità esposte in (7.3.1).

7.4 Precipitazione e filtrazione

Tirare a secco in evaporatore rotante (T=40°C) la soluzione metanolica contenente l'estratto dopo averla raccolta in un pallone da 250 mL. Riprendere il residuo con 5 mL di metanolo secondo le modalità esposte in 7.3.2. Versare la soluzione in un beaker, lavare il pallone con 40 mL di acqua e trasferire l'acqua di lavaggio nel beaker.

Acidificare con 0,5 mL di HC1 all'1% (6.6) ed agitare con agitatore magnetico. Aggiungere gradualmente 30 mL della soluzione precipitante (6.9) preparata di fresco miscelando 20 mL di soluzione A (6.7) con 10 mL di soluzione B (6.8). Prolungare l'agitazione per dieci minuti e poi lasciare decantare il precipitato formatosi per altri dieci minuti.
Per la filtrazione del precipitato utilizzare un crogiolo filtrante sul cui setto è posto un filtro in fibra di vetro (Whatman GF-F, porosità 0,8 μm) dello stesso diametro. Porre il crogiolo su una beuta da vuoto da 500 mL collegata alla linea da vuoto. Bagnare preventivamente il filtro con pochi millilitri di acido acetico glaciale e premerlo lungo i bordi con una bacchetta di vetro per farlo aderire al setto del crogiolo filtrante. Versare quindi la soluzione contenente il precipitato al centro del filtro, con regolarità, in modo che non possa aggirare il filtro passando direttamente sul setto sottostante.
Una volta filtrata tutta la soluzione, lavare il precipitato con cinque aliquote da 30 mL di acido acetico glaciale, ciascuna delle quali viene utilizzata preventivamente per sciacquare accuratamente il beaker di precipitazione ed è poi fatta percolare sul filtro secondo le modalità precedentemente esposte. Staccare, con l'ausilio di una pinzetta, il filtro dalla superficie del setto e porlo in un beaker da 250 mL.
Lavare il crogiolo filtrante, sul quale può comunque essersi depositato un poco di precipitato, con 20 mL di soluzione calda (80°C) di tartrato ammonico (6.11), che viene fatta percolare attraverso il setto e raccolta nel beaker contenente il filtro. Aggiungere nel beaker, sotto agitazione, altri 20 mL di soluzione calda di tartrato ammonico per sciogliere completamente il precipitato (si ha la completa decolorazione del filtro).
Spostare il filtro con una bacchetta di vetro facendolo aderire alla parete laterale del beaker e lavarlo abbondantemente con acqua usando una spruzzetta, portando il volume finale della soluzione a 200 mL.

7.5 Titolazione potenziometrica finale del bismuto

Aggiungere alla soluzione poche gocce di porpora bromocresolo (6.5) e, sotto agitazione, una soluzione di NH_3 al 16% (6.12) fino al viraggio dell'indicatore dal giallo al porpora. Aggiungere quindi 10 mL di soluzione tampone (6.13) e procedere alla titolazione sotto agitazione con NAPDC 0,0005 N (6.15), facendo attenzione che la punta della buretta contenente il titolante risulti immersa nella soluzione da titolare.
È necessario aspettare che il potenziale si stabilizzi prima di iniziare la titolazione. Se non si dispone di un sistema automatico di erogazione del titolante, aprire il rubinetto della buretta molto lentamente e regolare il flusso a un valore costante (20-50 μL/min per BIAS intorno a 50 μg/L). Campionare il potenziale a tempi regolari, infittendo la frequenza di misura quando il potenziale comincia a variare più velocemente (prossimità del punto equivalente). Il punto equivalente viene determinato in maniera soddisfacente attraverso il diagramma dei rapporti incrementali (DV/Dv) in funzione del volume di titolante (v).
Dispositivi costituiti da un sistema automatico di erogazione del titolante, titolatore potenziometrico e gestione dati automatizzato possono ridurre notevolmente i tempi di analisi nonchè aumentare la qualità delle stesse.
Allo scopo di ridurre la deriva di potenziale durante le titolazioni risulta di fondamentale importanza una frequente pulizia dell'elettrodo di platino. Tale pulizia va effettuata con apposita carta smeriglio.

8. Calcoli

Per calcolare i tensioattivi non ionici etossilati, espressi come BIAS, utilizzare la seguente relazione:

$$C = \frac{(a-b)\cdot F\cdot f}{v}$$

dove:
C = concentrazione (mg/L) di tensioattivi non ionici etossilati (BIAS);
a = volume (mL) di soluzione di NaPDC 0,0005 N utilizzati per la titolazione del campione;
b = volume (mL) di soluzione di NaPDC 0,0005 N utilizzati per la titolazione del bianco;
F = fattore di conversione specifico per ogni tensioattivo non ionico etossilato (54 per NP-10EO);
f = fattore di correzione del titolo della soluzione di NaPDC (6.15);
v = volume (mL) di campione.

9. Qualità del dato

Per quanto concerne la precisione, analisi effettuate da sei laboratori su 5 repliche di campioni reali aventi concentrazioni comprese nel campo di applicazione del metodo (0,05-0,5 mg/L) hanno fatto registrare valori del coefficiente di variazione, CV(%) = (scarto tipo/valore medio)·100, compresi tra il 10% e il 20%. Per concentrazioni di BIAS inferiori a 0,05 mg/L, valori del coefficiente di variazione compresi tra il 25% e il 35% si possono ritenere soddisfacenti.
Per quanto riguarda l'accuratezza, determinazioni eseguite su soluzioni sintetiche a basso contenuto di BIAS (0,05 mg/L) hanno evidenziato una sovrastima dei tensioattivi non ionici del 10-20%. Per concentrazioni superiori a 0,1 mg/L, lo scostamento dal valore vero è risultato del 5%.
Risultati ottenuti analizzando campioni di acqua di scarico (influenti ed effluenti di impianti di depurazione) nonché quelli riportati in letteratura evidenziano un'accuratezza inferiore a quella trovata per campioni sintetici.

BIBLIOGRAFIA

ARPINO A., CALATRONI C. & IACINI G. (1974): "La microdeterminazione dei tensioattivi non ionici etossilati", *La Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, **51**, 140-145.

BROWN D., DE HENAU H., GARRIGAN J.T., GERIKE P., HOLT M., KECK E., KUNKEL E., MATTHIJS F., WATERS J. & WATKINSON R.J. (1986): "Removal of Nonionics in a Sewage Treatment Plant", *Tenside Detergents*, **23**, (4), 190-195.

BROWN D., DE HENAU H., GARRIGAN J.T., GERIKE P., HOLT M., KECK E., KUNKEL E., MATTHIJS F., WATERS J. & WATKINSON R.J. (1987): "Removal of Nonionics in a Sewage Treatment Plant II", *Tenside Detergents*, **24**, (1), 14-19.

CAPRI S., ZANETTE S., MARCOMINI A. & PATROLECCO L. (1996): "Determinazione di tensioattivi non ionici nelle acque", *Notiziario dei Metodi Analitici IRSA*, marzo 1996, 14-23.

ISO (1984): "*Determination of non ionic surfactants*", ISO 7875/2.

O.C.D.E. (1976): "*Methode proposee pour la determination de la biodegradabilite des agents de surface utilises dans le detergents synthetiques*", Direction de l'environment, Paris.

WATERS J., GARRIGAN J.T. & PAULSON M. (1986): "Investigation into the scope and limitations of the bismuth active substances procedure (Wìckbold) for the determination of nonionic surfactant in environmental samples", *Wat. Res.*, **20**, (2), 247-253.

WICKBOLD R. (1972): "Zur Bestimmung nichtionischer Tenside Fluss und Abwasser", *Tenside Detergents*, **9**, 173-177.

APAT
Agenzia per la protezione
dell'ambiente e per i servizi tecnici

IRSA-CNR
Istituto di Ricerca sulle Acque
Consiglio Nazionale delle Ricerche

Metodi analitici per le acque

Volume Terzo

Sezione 6000 - Metodi microbiologici - Parte generale
Sezione 7000 - Determinazione di microorganismi
Sezione 8000 - Metodi ecotossicologici
Sezione 9000 - Indicatori biologici

APAT
Manuali e Linee Guida 29/2003

Informazioni legali
L'Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici (**APAT**) o le persone che agiscono per suo conto non sono responsabili dell'uso che può essere fatto delle informazioni contenute in questo manuale.

APAT - Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici
Via Vitaliano Brancati, 48 - 00144 Roma
www.apat.it

CNR-IRSA - Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto di Ricerca sulle Acque
Via Reno, 1 - 00198 Roma
www.irsa.rm.cnr.it

© APAT, Rapporti 29/2003

ISBN 88-448-0083-7

Riproduzione autorizzata citando la fonte

Elaborazione grafica
APAT

Grafica di copertina: Franco Iozzoli

Foto: Paolo Orlandi

Coordinamento tipografico
APAT

Impaginazione e stampa
I.G.E.R. srl - Viale C.T. Odescalchi, 67/A - 00147 Roma

Stampato su carta TCF

Finito di stampare febbraio 2004

Il manuale "Metodi Analitici per le Acque" è pubblicato nella serie editoriale "Manuali e Linee Guida" dell'Agenzia per la Protezione dell'Ambiente e per i Servizi Tecnici (APAT).

L'opera si articola in tre volumi, suddivisi in sezioni (da 1000 a 9040). Fatta eccezione per la parte generale (sezioni 1000-1040), ogni sezione contiene uno o più metodi, costituiti da capitoli, paragrafi e sottoparagrafi.

I metodi analitici riportati nel manuale sono stati elaborati da una Commissione istituita nel 1996 dall'Istituto di Ricerca sulle Acque del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IRSA-CNR), per l'aggiornamento e l'ampliamento dei metodi riportati nel Quaderno 100 "Metodi analitici per le acque", pubblicato dall'IRSA-CNR ed edito dal Poligrafico dello Stato nel 1994.

Un Gruppo di Lavoro, coordinato dall'APAT, e formato dal Servizio di Metrologia Ambientale dell'APAT, dall'Istituto di Ricerca sulle Acque del Consiglio Nazionale delle Ricerche (IRSA-CNR), dalle Agenzie Regionali per la Protezione dell'Ambiente (ARPA) e dalle Agenzie Provinciali per la Protezione dell'Ambiente (APPA), con il contributo del Centro Tematico Nazionale "Acque interne e marino costiere" (CTN/AIM), ha provveduto ad una revisione critica e ad una integrazione dei metodi analitici prodotti dalla Commissione istituita dall'IRSA-CNR.

I metodi analitici riportati nel presente manuale possono essere riprodotti ed utilizzati purché ne sia citata la fonte.

L'edizione finale è a cura di:
Maria Belli, Damiano Centioli, Paolo de Zorzi, Umberto Sansone
(Agenzia per la protezione dell'ambiente e per i servizi tecnici - APAT)
Silvio Capri, Romano Pagnotta, Maurizio Pettine
(Consiglio Nazionale delle Ricerche - Istituto di Ricerca sulle Acque - CNR-IRSA)

Indice

VOLUME 1

PRESENTAZIONE

PREMESSA

1000 - PARTE GENERALE
1010 - Strutture, attrezzature e reattivi di laboratorio 5
1020 - Lineamenti di tecniche analitiche 25
1030 - Metodi di campionamento 75
1040 - Qualità del dato analitico 87

2000 PARAMETRI FISICI, CHIMICI E CHIMICO-FISICI
2010 - Acidità e alcalinità (Acidità: titrimetrico; Alcalinità: potenziometrico e titrimetrico) 115
2020 - Colore (qualitativo; spettrofotometrico; metodo al platino-cobalto) 123
2030 - Conducibilità 131
2040 - Durezza (per calcolo; complessometrico con EDTA) 137
2050 - Odore 141
2060 - pH 145
2070 - Salinità 153
2080 - Sapore 157
2090 - Solidi (totali disciolti; totali sospesi; sedimentabili; fissi e volatili a 600°C) 161
2100 - Temperatura 171
2110 - Torbidità 177
2120 - Trasparenza 183

3000 - METALLI E SPECIE METALLICHE
3010 - Trattamento preliminare dei campioni per l'analisi dei metalli mediante mineralizzazione acida 189
3020 - Determinazione di elementi chimici mediante spettroscopia di emissione con sorgente al plasma (ICP-OES) 197
3030 - Determinazione di cationi (sodio, ammonio, potassio, magnesio, calcio) mediante cromatografia ionica 215
3040 - Metodi di preconcentrazione per la determinazione di metalli in tracce 225
3050 - Alluminio (F-AAS; ETA-AAS; spettrofotometrico con eriocromocianina R) 237
3060 - Antimonio (ETA-AAS; HG-AAS) 251
3070 - Argento (ETA-AAS; APDC+ETA-AAS) 263
3080 - Arsenico (HG-AAS; spettrofotometrico con dietilditiocarbammato di argento) 271
3090 - Bario (F-AAS; ETA-AAS) 283
3100 - Berillio (ETA-AAS) 291
3110 - Boro (spettrofotometrico con curcumina; spettrofotometrico con carminio) 297
3120 - Cadmio (F-AAS; ETA-AAS) 303
3130 - Calcio (F-AAS) 311
3140 - Cobalto (ETA-AAS) 315

3150 - Cromo (Cromo totale: F-AAS; ETA-AAS; Cromo VI: APDC+ETA-AAS; Cromo III: ETA-AAS dopo eliminazione di Cromo VI; Cromo totale: coprecipitazione con Fe $(OH)_3$+ETA-AAS; Cromo VI: spettrofotometrico con difenilcarbazide) 321
3160 - Ferro (F-AAS; ETA-AAS) 345
3170 - Litio (F-AAS) 355
3180 - Magnesio (F-AAS) 359
3190 - Manganese (F-AAS; ETA-AAS) 363
3200 - Mercurio (ossidazione con $KMnO_4$+CV-AAS; ossidazione con HNO_3 mediante microonde +CV-AAS; ossidazione con HNO_3 mediante microonde +CV-AAS e amalgama su oro) 373
3210 - Molibdeno (ETA-AAS) 391
3220 - Nichel (F-AAS; ETA-AAS) 397
3230 - Piombo (F-AAS; ETA-AAS; spettrofotometrico con ditizone) 405
3240 - Potassio (F-AAS) 419
3250 - Rame (F-AAS; ETA-AAS; spettrofotometrico con ossalildiidrazide) 423
3260 - Selenio (HG-AAS; spettrofotometrico con o-fenilendiammina) 435
3270 - Sodio (F-AAS) 445
3280 - Stagno (F-AAS; ETA-AAS; spettrofotometrico con violetto di catechina) 449
3290 - Tallio (ETA-AAS; APDC+ETA-AAS) 461
3300 - Tellurio (ETA-AAS) 471
3310 - Vanadio (ETA-AAS; coprecipitazione con $Fe(OH)_3$+ETA-AAS) 477
3320 - Zinco (F-AAS) 487

VOLUME 2

4000 - COSTITUENTI INORGANICI NON METALLICI
4010 - Anidride carbonica 495
4020 - Anioni (fluoruro, cloruro, nitrito, bromuro, nitrato, fosfato e solfato) in cromatografia ionica 499
4030 - Azoto ammoniacale (spettrofotometrico all'indofenolo; spettrofotometrico con reattivo di Nessler; potenziometrico; spettrofotometrico o titrimetrico, previa distillazione) 509
4040 - Azoto nitrico (spettrofotometrico mediante salicilato di sodio; spettrofotometrico con NEDA) 525
4050 - Azoto nitroso 533
4060 - Azoto totale e fosforo totale 537
4070 - Cianuro 541
4080 - Cloro attivo libero 547
4090 - Cloruro (titolazione argentometrica, mercurimetrica e potenziometrica) 553
4100 - Fluoruro (spettrofotometrico; potenziometrico) 565
4110 - Fosforo (ortofosfato; fosforo totale) 575
4120 - Ossigeno disciolto (titolazione iodometrica; titolazione potenziometrica) 583
4130 - Silice 595
4140 - Solfato (gravimetrico; torbidimetrico) 599
4150 - Solfito (titolazione iodometrica; metodo cromatografico) 605
4160 - Solfuro 613

5000 - COSTITUENTI ORGANICI
5010 - Aldeidi (composti carbonilici) (spettrofotometrico con MBTH; derivatizzazione + SPE+HPLC-UV; derivatizzazione + LLE+GC-ECD) 621
5020 - Ammine alifatiche (GC-AFD) 635
5030 - Azoto organico 641
5040 - Carbonio organico disciolto 645

5050 - Diserbanti ureici (LLE o SPE+HPLC-UV) 653
5060 - Prodotti fitosanitari (antiparassitari, pesticidi) (LLE o SPE+GC-NPD o HPLC-UV o GC-MS) 661
5070 - Fenoli (spettrofotometrico con 4-amminoantipirina previa estrazione; spettrofotometrico diretto con 4-amminoantipirina; LLE o SPE+HPLC-UV) 679
5080 - Idrocarburi policiclici aromatici (LLE o SPE+GC-MS; LLE o SPE+HPLC-UV o HPLC-fluorescenza) 697
5090 - Pesticidi clorurati (LLE+GC-ECD) 707
5100 - Pesticidi fosforati (LLE+GC-FPD) 723
5110 - Policlorobifenili e policloroterfenili (LLE+GC-MS o GC-ECD) 743
5120 - Richiesta biochimica di ossigeno (BOD_5) 767
5130 - Richiesta chimica di ossigeno (COD) 781
5140 - Solventi organici aromatici (spazio di testa statico +GC-FID; spazio di testa dinamico+GC-FID) 789
5150 - Solventi clorurati (spazio di testa statico+GC-ECD; spazio di testa dinamico+GC-ECD) 799
5160 - Sostanze oleose (grassi e oli animali e vegetali; idrocarburi totali) (gravimetrico; IR) 811
5170 - Tensioattivi anionici (MBAS) 827
5180 - Tensioattivi non ionici (BIAS) 833

VOLUME 3

6000 - METODI MICROBIOLOGICI - PARTE GENERALE
6010 - Modalità di campionamento 845
6020 - Lineamenti di tecniche analitiche 849
6030 - Generalità sui terreni di coltura per batteriologia 853
6040 - Attrezzature di base per le analisi microbiologiche delle acque 855

7000 - METODI PER LA DETERMINAZIONE DI MICROORGANISMI INDICATORI DI INQUINAMENTO E DI PATOGENI
7010 - Coliformi totali 865
7020 - Coliformi fecali 875
7030 - *Escherichia coli* 883
7040 - Streptococchi fecali ed enterococchi 895
7050 - Conteggio delle colonie su agar a 36°C e 22°C 909
7060 - Spore di clostridi solfito riduttori 913
7070 - *Aeromonas spp* 921
7080 - *Salmonella spp* 927
7090 - *Vibrio spp* 935
7100 - Uova di elminti 941
7110 - Batteriofagi 945
7120 - Enterovirus 959
7130 - Oocisti di *Cryptosporidium* e cisti di *Giardia* 971

8000 - METODI ECOTOSSICOLOGICI
8010 - Metodi di valutazione della tossicità con pesci 985
8020 - Metodi di valutazione della tossicità con *Daphnia* 993
8030 - Metodo di valutazione della tossicità acuta con batteri bioluminescenti 1003
8040 - Metodo di valutazione della tossicità acuta con *Ceriodaphnia dubia* 1013
8050 - Metodo di valutazione della tossicità acuta con *Mysidopsis bahia* 1027
8060 - Metodo di valutazione della tossicità acuta con *Artemia sp.* 1043

8070 - Metodo di valutazione della tossicità acuta con *Cyprinodon variegatus* 1051
8080 - Metodo di valutazione della tossicità acuta con trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) 1065
8090 - Metodo di valutazione della tossicità cronica (7 giorni) con *Mysidopsis bahia* 1075
8100 - Metodo di valutazione della tossicità cronica (7 giorni) con *Ceriodaphnia dubia* 1085
8110 - Metodo di valutazione della tossicità cronica (7 giorni) con *Cyprinodon variegatus* 1091
8120 - Saggio di tossicità prolungato (14-28 giorni) con trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) (metodo preliminare) 1099
8130 - Analisi statistica dei risultati di saggi cronici 1109

9000 - INDICATORI BIOLOGICI
9010 - Indice biotico esteso (I.B.E.) 1115
9020 Determinazione della clorofilla: metodo spettrofotometrico 1137
9030 Determinazione dell'adenosintrifosfato (ATP) 1143
9040 Conta diretta dell'abbondanza microbica (DAPI) 1149

6000 - METODI MICROBIOLOGICI

La presenza di contaminanti di natura biologica nelle acque ha particolare rilevanza per le possibili conseguenze sulla salute dell'uomo e/o degli animali. Organismi (patogeni e opportunisti patogeni) capaci di provocare malattie trasmesse per via idrica possono essere eliminati con le feci di individui infetti, raggiungere l'ambiente acquatico e, attraverso differenti modalità, possono infettare e dare origine a patologie in altri soggetti, garantendo, in tal modo, la circolazione dei patogeni (circuito fecale-orale). Nelle acque vengono a ritrovarsi tuttavia anche quei microrganismi generalmente di per sé non patogeni, a prevalente habitat intestinale, la cui presenza nell'ambiente idrico costituisce un indice indiretto e teorico della eventuale contemporanea presenza di patogeni. Essi costituiscono il gruppo dei microrganismi definiti indicatori di contaminazione fecale, la cui ricerca costituisce la parte largamente prevalente dell'esame microbiologico delle acque e quella universalmente praticata. Ciò è dovuto essenzialmente a motivi di ordine pratico, legati alla relativa semplicità nel rilevamento degli indicatori a fronte della ricerca dei patogeni. Diverse difficoltà pratiche si oppongono infatti all'adozione routinaria del rilevamento di patogeni (enterobatteri, virus e parassiti) nelle acque, anche se, disponendo di laboratori sufficientemente attrezzati e di personale specializzato, è comunque possibile effettuare questo tipo di indagini.
L'esame microbiologico delle acque dà la possibilità di verificare l'eventuale presenza dei microrganismi presenti in esse, mediante valutazioni quali-quantitative basate su tecniche analitiche che ne permettono l'evidenziazione e/o lo sviluppo.
L'analisi microbiologica riveste particolare importanza quando si considerino acque destinate all'approvvigionamento idrico-potabile sia in relazione alla loro qualità in funzione del trattamento di disinfezione cui debbono essere sottoposte, sia dopo la loro immissione nella rete idrica. Analogamente, con il controllo microbiologico si definisce la qualità di acque superficiali, quando vengano destinate ad usi a rilevanza igienico-sanitaria e di acque reflue che, con il loro apporto inquinante, influenzano e modificano le caratteristiche del corpo idrico recettore (fiume, lago, mare).
Per la ricerca di microrganismi di natura batterica l'esame si basa, generalmente e di routine, sulla possibilità di coltivare su idonei substrati, ed in idonee condizioni colturali, i batteri contenuti nell'acqua in esame, utilizzando particolari metodologie finalizzate all'individuazione differenziale di specie o di gruppi microbici che si ritengono significativi ai fini del giudizio igienico e/o di qualità dell'acqua in esame.
I metodi batteriologici tradizionali sono basati sulla semina in idonei terreni di coltura, in genere liquidi, e sulla incubazione in specifiche condizioni, di aliquote dell'acqua da esaminare. Dopo incubazione la presenza o l'assenza del microrganismo ricercato nell'aliquota di campione seminata viene messa in evidenza sulla base della eventuale variazione subita dal terreno insemenzato (intorbidimento, cambiamento di colore, ecc.). Eventuali prove successive, partendo dalla coltura iniziale, costituiscono prove di conferma alle quali possono fare seguito ulteriori saggi per la definitiva identificazione dei microrganismi ricercati.
Utilizzando terreni differenti ed opportune temperature di incubazione, è possibile rendere selettivo il metodo al fine di coltivare solo i gruppi microbici di interesse e, talora, una singola specie batterica.
Una variante introdotta da tempo nel metodo tradizionale è costituita dalla semina di quantità scalari del campione al fine di pervenire ad una stima probabilistica del numero di microrganismi presenti (metodo MPN o del numero più probabile o dei tubi multipli).
L'analisi di piccoli volumi di acqua può essere svolta con la tecnica della semina di aliquote del campione su/in terreni solidificati all'agar. Dopo opportuna incubazione, il numero delle colonie sviluppate permette di risalire al numero di batteri presenti per unità di volume del

campione, partendo dal presupposto che ogni colonia abbia origine da un solo microrganismo. La semina può essere effettuata sulla superficie del terreno agarizzato già solidificato in piastra di Petri (non è ordinariamente possibile seminare aliquote superiori a 0,1-1 mL) o nello spessore del terreno all'agar (generalmente non è possibile seminare aliquote superiori a 2 mL). È pertanto evidente che questa metodica è utilizzabile solo per mettere in evidenza microrganismi presenti nel campione in numero relativamente elevato e che quindi siano in numero consistente in volumi ridotti.
La tecnica che è andata affermandosi negli ultimi decenni è comunque quella della filtrazione su membrana che permette l'esame anche di grandi volumi di acqua qualora la qualità dell'acqua lo consenta. Tuttavia, in alcuni casi, la presenza di particellato in sospensione può causare l'otturazione dei pori della membrana, fattore che costituisce il limite alla filtrazione di quantitativi di acqua troppo elevati. Comunque, la metodica della filtrazione su membrana, oltre a consentire l'esame di elevati volumi di acqua, presenta diversi vantaggi semplificando le procedure di laboratorio, abbreviandone i tempi operativi anche in funzione dei tempi di incubazione; inoltre consente, ordinariamente, di rilevare direttamente (per conteggio diretto) il numero di microrganismi presenti nel campione esaminato ed è agevolmente adattabile a situazioni di emergenza.
Diversamente, la ricerca di organismi di altra natura (virus, parassiti, metazoi) comporta l'uso di metodologie complesse, generalmente costose, specifiche per l'organismo o il gruppo di organismi ricercati e applicabili da personale specializzato. Inoltre, generalmente, queste tecniche forniscono risposte in tempi lunghi necessitando fasi diverse di preparazione del campione legate anche all'esigenza di concentrare grandi volumi di acqua in relazione all'ampia variabilità delle concentrazioni dei patogeni nelle acque.

6010. Modalità di campionamento

Il prelievo dei campioni per l'esame microbiologico deve essere effettuato con recipienti puliti e la sterilità è funzione delle determinazioni che devono essere effettuate e del tipo di acqua che si deve analizzare. Poiché il rischio di contaminazione del campione diminuisce quanto più sono inquinate le acque da controllare, il prelievo di campioni per la caratterizzazione e/o il controllo delle acque reflue è meno problematico anche se, in questo caso, è necessario osservare norme igieniche di sicurezza a tutela della salute dell'operatore.
Per i prelievi da effettuare per immersione della bottiglia, (acque superficiali, raccolte idriche in genere) si devono usare bottiglie sterili incartate prima della sterilizzazione e al momento dell'immersione la bottiglia deve essere afferrata con una pinza o con altro idoneo sistema che permetta l'apertura del tappo a comando per mezzo di dispositivi adatti.
Le bottiglie utilizzate per prelevare campioni per analisi microbiologiche, non devono mai essere sciacquate all'atto del prelievo. Il risciacquo oltre ad esporre la bottiglia a possibili contaminazioni, asporterebbe dalla bottiglia il tiosolfato eventualmente presente.
All'atto del prelievo, la bottiglia sterile deve essere aperta avendo cura di non toccare la parte interna del tappo che andrà a contatto con il campione prelevato, né l'interno del collo della bottiglia; subito dopo il prelievo si deve provvedere all'immediata chiusura della stessa.
Nell'eseguire i prelievi si deve sempre avere cura di non riempire completamente la bottiglia al fine di consentire una efficace agitazione del campione al momento dell'analisi in laboratorio.
Se l'acqua da esaminare è clorata, le bottiglie di prelievo devono contenere sodio tiosolfato in concentrazione idonea ad inibire l'azione disinfettante del cloro. Con le concentrazioni di cloro generalmente in uso è sufficiente una soluzione al 10% di sodio tiosolfato, nella quantità di 0,1 mL per ogni 100 mL di capacità della bottiglia aggiunto prima della sterilizzazione.
Per l'esecuzione delle analisi si deve provvedere al prelievo in bottiglia di quantitativi di acqua di poco superiori al minimo necessario per procedere allo svolgimento degli esami richiesti. Per la ricerca di patogeni (es. virus, parassiti), e quindi eventualmente per la necessità di prelevare grandi volumi di acqua, è opportuno effettuare il prelievo/concentrazione del campione *in situ*.
Il campione prelevato deve essere accompagnato da tutte le indicazioni necessarie alla sua identificazione, quali la data e l'ora del campionamento, il tipo di acqua, la precisa annotazione del punto in cui è stato effettuato il prelievo e devono altresì essere trasmesse, con il campione, tutte le indicazioni concernenti le eventuali determinazioni effettuate in loco e qualunque altra osservazione possa risultare utile nella interpretazione dei risultati di laboratorio. A parte ogni esigenza di natura giuridica, che può prevedere precise modalità di identificazione del campione, è comunque assolutamente necessario che il campione venga contrassegnato sia con il codice numerico, sia con l'indicazione in chiaro del punto di campionamento.

1. Parametri da rilevare all'atto del campionamento

La raccolta del campione deve essere accompagnata da alcune determinazioni da effettuare preferibilmente (alcune obbligatoriamente) sul luogo. Si tratta di determinazioni di alcuni parametri fisici e chimico-fisici che, durante la conservazione ed il trasporto, vanno incontro a variazioni tali da non consentire più la loro corretta misurazione in laboratorio. I parametri da rilevare sul luogo variano molto in relazione al tipo di acqua, all'uso ed al tipo di analisi da eseguire.
La temperatura, uno dei parametri che durante la conservazione ed il trasporto del campio-

ne va incontro a modifiche, va misurata *in situ* all'atto del prelievo utilizzando un termometro di idonea sensibilità o una sonda che presenta il vantaggio, rispetto al termometro, di rilevare la temperatura dell'acqua anche a differenti profondità, al di sotto del pelo libero dell'acqua. Il termometro classicamente utilizzato per la misura della temperatura dell'acqua è il cosiddetto termometro a pozzetto. Esso è dotato di un piccolo recipiente alla sua estremità, dalla parte del bulbo del termometro, solidale con il termometro stesso, nel quale si raccoglie l'acqua prelevata con l'immersione. Consente alla colonnina termometrica (in genere di mercurio) di rimanere al livello corrispondente alla temperatura del campione, per il tempo necessario ad effettuare la lettura, in quanto il bulbo del termometro continua ad essere immerso nell'acqua campionata.
Anche la concentrazione di ossigeno disciolto fa parte di quei parametri che possono andare incontro a modifiche durante il trasporto, modifiche che possono togliere significato alla determinazione effettuata in laboratorio. La determinazione in loco si effettua con apposite sonde (metodo elettrometrico) alcune delle quali (le sonde multiparametriche) hanno il vantaggio di consentire la misura di più parametri.
La concentrazione di cloro attivo, richiesta obbligatoriamente in alcuni casi (es. acque di scarico), deve necessariamente essere effettuata in loco. Infatti l'eventuale presenza di sostanze riducenti (in primo luogo le sostanze organiche) determina un progressivo consumo di cloro durante la conservazione ed il trasporto. La determinazione effettuata in laboratorio risulta modificata fornendo valori nettamente inferiori di cloro-attivo rispetto ai valori presenti nel campione all'origine.
La determinazione del pH deve essere effettuata in loco soprattutto in quei casi in cui la presenza concomitante di sostanze interferenti, non sempre note, può provocare sensibili variazioni del valore del pH durante la conservazione ed il trasporto. La determinazione in loco deve essere effettuata preferibilmente con il metodo elettrometrico. La determinazione con metodi colorimetrici (cartine per la misura del pH la cui colorazione assunta, a contatto con l'acqua, viene raffrontata ad una scala cromatica) è da ritenere estremamente imprecisa e da tenere in considerazione solo in situazioni di emergenza.

2. Modalità e tempi di trasporto e conservazione

Tutti i campioni di acqua, indipendentemente dalla loro natura, devono essere esaminati nel minore tempo possibile. Il trasporto deve avvenire in modo che i campioni siano mantenuti al riparo dalla luce e ad una temperatura compresa fra +4° e +10°C.
Le alterazioni cui possono andare incontro i campioni prelevati, in seguito alla inosservanza dei tempi e/o delle modalità di trasporto, sono influenzate dalla composizione chimica dell'acqua, dal pH, dall'azoto proteico, dalla qualità e dalla quantità della flora batterica presente e da altri fattori indeterminati.
Tra il momento del prelievo e l'esecuzione delle analisi microbiologiche, i tempi massimi consigliati per l'esame di acque dolci superficiali, acque marine e acque di scarico vanno da un minimo di 6-8 ore, con l'obbligo di non superare un periodo medio di 24 ore. Quando non sia possibile rispettare i tempi sopracitati, deve essere considerata la possibilità di utilizzare, almeno per alcune indagini microbiologiche, idonei sistemi analitici portatili o laboratori mobili.
Al fine di consentire il mantenimento della temperatura richiesta (+4 ÷10°C) è necessario usare frigoriferi portatili o contenitori termoisolanti utilizzando, per il mantenimento della temperatura, apposite piastre frigorifere commerciali, ma evitando comunque il congelamento del campione (ad eccezione di campioni in cui sono da ricercare virus).
Durante il trasporto le bottiglie devono essere collocate nel contenitore in modo da impedire il loro rovesciamento e, fra le bottiglie, devono essere collocati idonei sistemi di separazione per evitare rotture.
Di seguito vengono indicati i tempi massimi raccomandati per la conservazione dei campioni in funzione dei microrganismi da ricercare (Tab. 1).

Tabella 1: Tempi massimi (ancora accettabili) raccomandati per la conservazione dei campioni per analisi microbiologiche

Gruppi di organismi da ricercare	Tempo massimo (accettabile) in ore
Organismi vitali a 22°C o 36°C	8 (12)
Escherichia coli e coliformi	12 (18)
Enterococchi	12 (18)
Batteri e spore di Clostridi solfito-riduttori	48 (72)
Batteriofagi	48 (72)
Salmonella e altre Enterobatteriacee	12 (18)
Enterovirus	48 (72)
Cisti/oocisti di Giardia/Cryptosporidium	48 (72)
Amoebae	48 (72)
Staphylococcus	8 (12)
Pseudomonas aeruginosa	8 (12)
Legionella	48 (72)
Cianobatteri	48 (72)
Campylobacter	6 (8)
Uova di Elminti (a pH 2,0)	48 (72)

6020. Lineamenti di tecniche analitiche

METODO A - Tecnica del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN)

La tecnica dell'MPN è particolarmente consigliabile per l'analisi di acque con particolato in sospensione. Questa tecnica può essere impiegata come alternativa a quella delle membrane filtranti nei casi in cui si analizzino campioni di acqua che superino il valore di 1 unità nefelometrica di torbidità (NTU). I volumi di acqua che possono essere esaminati con questa tecnica sono ridotti in considerazione delle difficoltà tecniche di preparazione e distribuzione di aliquote elevate del campione di acqua da esaminare.
Il metodo dei tubi multipli fornisce una stima statistica della densità batterica del campione analizzato. Si basa infatti sulla combinazione dei tubi positivi e negativi ottenuti inoculando aliquote del campione in terreno colturale liquido. La precisione del risultato dipende dal numero dei tubi di terreno colturale liquido insemenzati con l'acqua in esame. Infatti, a meno che non venga esaminato un gran numero di aliquote di acqua, la precisione del risultato è piuttosto bassa.
Il risultato si ottiene calcolando il valore dell'indice MPN in base alla formula di Thomas (1):

$$\text{MPN/100 mL} = \frac{\text{Numero di tubi positivi} \cdot 100}{\sqrt{\text{mL di campione nei tubi negativi} \cdot \text{mL di campione in tutti i tubi}}} \qquad (1)$$

Tuttavia, il risultato già calcolato può essere ricavato, in base alle diverse combinazioni dei tubi positivi e negativi, da una apposita tabella già predisposta (Tab. 1). Essa riporta il valore dell'indice MPN corrispondente a diverse combinazioni di risultati positivi e i limiti fiduciali, al 95%, che indicano il limite inferiore e il limite superiore entro i quali ci si può attendere, con una probabilità del 95%, che sia compresa la densità reale dei microrganismi.

Procedura

Agitare vigorosamente il campione di acqua da analizzare. Seminare aliquote scalari del campione in serie di matracci o tubi multipli contenenti terreno colturale liquido. Il terreno si prepara a concentrazione tale che inoculi del campione superiori a 10 mL non diluiscano la concentrazione del mezzo al di sotto di quella del terreno standard. Incubare a temperatura idonea e per il periodo di tempo richiesto in base al microrganismo da ricercare. Leggere i risultati in funzione della presenza di reazioni positive e negative (es. torbidità, produzione di gas, produzione di acido) ed eventualmente procedere allo svolgimento di prove di conferma. Con riferimento alla tabella 1 calcolare il valore dell'indice MPN riferito a 100 mL di campione. Quando l'acqua in esame ha una bassa carica microbica è necessario analizzare volumi più grandi. In questo caso, da una semina di 100, 10 e 1 mL si otterrà un valore dell'indice MPN ricavato dalla tabella che dovrà essere moltiplicato per 0,1. Se, d'altra parte, le quantità seminate saranno 1, 0,1 e 0,01 mL, il valore riportato in tabella 1 dovrà essere moltiplicato 10, oppure 100 volte se le aliquote seminate saranno di 0,1, 0,01 e 0,001 mL.

METODO B - Metodo della filtrazione su membrana (MF)

La metodica della filtrazione su membrana si adatta a tutti i tipi di acqua, tranne che a quelle particolarmente torbide. Consente di ottenere risultati in tempi più brevi rispetto a quelli richiesti con il metodo del numero più probabile (MPN); inoltre permette di esaminare anche grandi volumi di acqua di buona qualità. Presenta diversi vantaggi consentendo di rilevare direttamente (per conta diretta) il numero di microrganismi presenti nel campione esaminato, contando le colonie sviluppate su una membrana, semplificando le procedure di laboratorio e abbreviando i tempi operativi anche in funzione dei tempi di incubazione.
La procedura della filtrazione su membrana permette di contare i microrganismi che, presenti in un campione di acqua, sulla superficie della membrana, posta su terreno di coltura agarizzato, hanno prodotto colonie. Poiché non è possibile determinare se una colonia individuale sia formata da una o più cellule batteriche, il numero di colonie ottenuto si riporta come "Unità Formante Colonia" (UFC), valore poi riferito, generalmente, a 100 mL del campione analizzato. Si accetta, pertanto, che una cellula batterica produca una colonia e che la conta riporti direttamente il numero di batteri presente.
L'accuratezza del risultato dipende dal numero di colonie contate. È necessario, infatti, che il numero delle colonie sia compreso in limiti leggibili. Un numero di colonie della membrana compreso generalmente tra 20 e 80 e non superiore a 200 fornisce un risultato accettabile e statisticamente accurato.
Il numero di microrganismi presenti nel campione esaminato si ottiene dalla equazione (2):

$$\text{UFC/100 mL} = \frac{\text{N° delle colonie contate} \cdot 100}{\text{mL di campione filtrati}} \qquad (2)$$

Procedura

Con una pinzetta sterile prendere, in condizioni di asepsi, una membrana di esteri di cellulosa con porosità nominale 0,45 μm e, con il lato quadrettato verso l'alto, centrarla sulla base di un supporto filtrante. Fissare con l'idonea pinza il bicchiere (di vetro Pirex, di acciaio inossidabile o di policarbonato) al supporto filtrante. Dopo avere adeguatamente agitato il campione di acqua o l'eventuale sua diluizione, prelevare, con una pipetta (micropipetta o pipetta automatica) o un cilindro graduato sterili, il volume di acqua da analizzare e versarlo nel bicchiere. Filtrare attraverso la membrana utilizzando una pompa da vuoto o una pompa ad acqua. Sciacquare i bordi del bicchiere versando acqua distillata sterile o soluzione diluente. Dopo la filtrazione trasferire la membrana, con il lato quadrettato verso l'alto, su idoneo terreno di coltura agarizzato in piastra Petri.

METODO C – Metodo dell'agar-germi

Il metodo, con il quale si analizzano piccole aliquote di campione o sue diluizioni, permette di contare i microrganismi capaci di moltiplicarsi e crescere nello spessore del terreno agarizzato. Poiché si considera che ciascuna cellula microbica formi una colonia, sarebbe idoneo poter contare un numero totale di colonie compreso tra 30 e 300.
Con questa procedura è necessario porre particolare attenzione alla temperatura del terreno colturale mantenuto liquido che, a temperature superiori a 45°C, potrebbe provocare shock termici alle cellule microbiche.

Procedura

Seminare in capsule Petri vuote aliquote non superiori a 2 mL del campione o di una sua diluizione. Versare, rispettando le regole di asepsi, circa 15 mL di substrato nella capsula contenente l'inoculo. Non superare i 20 minuti di intervallo tra il momento dell'inoculo in capsu-

la e l'aggiunta del terreno colturale che deve essere mantenuto liquefatto in bagnomaria ad una temperatura tra i 43°C e i 45°C. Mescolare accuratamente ruotando in un verso e nell'altro la piastra per permettere una completa miscelazione tra il terreno ed il campione. Lasciare solidificare e porre ad incubare a temperatura idonea. Dopo incubazione, contare le colonie cresciute e scartare le piastre con crescita confluente. Riportare il numero ottenuto come Unità Formanti Colonia per millilitro (UFC/mL) del campione.

Tabella 1: Indice MPN e limite di confidenza al 95% per varie combinazioni di risultati positivi quando serie di 3 o 5 tubi vengono inoculati con diluizioni di 10 mL, 1 mL, 0,1 mL.

Combinazioni di tubi positivi	Diluizioni					
	3 Tubi Indice	Limiti di confidenza al 95%		5 Tubi Indice	Limiti di confidenza al 95%	
	MPN/100 mL	INFERIORE	SUPERIORE	MPN/100mL	INFERIORE	SUPERIORE
0-0-0	< 3			< 2		
0-0-1	3	< 0.5	9	2	< 0.5	7
0-1-0	3	< 0.5	13	2	< 0.5	7
0-2-0				4	< 0.5	11
1-0-0	4	< 0.5	20	2	< 0.5	7
1-0-1	7	1	21	4	< 0.5	11
1-1-0	7	1	23	4	< 0.5	11
1-1-1	11	3	36	6	< 0.5	15
1-2-0	11	3	36	6	< 0.5	15
2-0-0	9	1	36	4	< 0.5	13
2-0-1	14	3	37	7	1	17
2-1-0	15	3	44	7	1	17
2-1-1	20	7	89	9	2	21
2-2-0	21	4	47	9	2	21
2-2-1	28	10	150			
2-3-0				12	3	28
3-0-0	23	4	120	8	1	19
3-0-1	39	7	130	11	2	25
3-0-2	64	15	380			
3-1-0	43	7	210	11	2	25
3-1-1	75	14	230	14	4	34
3-1-2	120	30	380			
3-2-0	93	15	380	14	4	34
3-2-1	150	30	440	17	5	46
3-2-2	210	35	470			
3-3-0	240	36	1300			
3-3-1	460	71	2400			
3-3-2	1100	150	4800			
3-3-3	≥2400					
4-0-0				13	3	31
4-0-1				17	5	46
4-1-0				17	5	46
4-1-1				21	7	63
4-1-2				26	9	78
4-2-0				22	7	67
4-2-1				26	9	78
4-3-0				27	9	80
4-3-1				33	11	93
4-4-0				34	12	93

segue

segue

Combinazioni di tubi positivi	Diluizioni					
	3 Tubi Indice	Limiti di confidenza al 95%		5 Tubi Indice	Limiti di confidenza al 95%	
	MPN/100 mL	INFERIORE	SUPERIORE	MPN/100mL	INFERIORE	SUPERIORE
5-0-0				23	7	70
5-0-1				31	11	89
5-0-2				43	15	110
5-1-0				33	11	93
5-1-1				46	16	120
5-1-2				63	21	150
5-2-0				49	17	130
5-2-1				70	23	170
5-2-2				94	28	220
5-3-0				79	25	190
5-3-1				110	31	250
5-3-2				140	37	340
5-3-3				180	44	500
5-4-0				30	35	300
5-4-1				170	43	490
5-4-2				220	57	700
5-4-3				280	90	850
5-4-4				350	120	1000
5-5-0				240	68	750
5-5-1				350	120	1000
5-5-2				540	180	1400
5-5-3				920	300	3200
5-5-4			1	600	640	5800
5-5-5				≥2400		

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for examination of water and wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA).

DALLA VALLE J.M. (1941): "Notes on the most probable number Index as used in bacteriology", *Publ. Health Rep.*, **58,** 299.

DUTKA B.D. (1981): "*Membrane filtration applications. Techniques and problems*", Marcel Dekker, Inc, New York.

MACCRADY M.H. (1918): "Tables for rapid interpretation for fermentation-tube results", *Publ. Health J.*, **9**, 201-204.

6030. Generalità sui terreni di coltura per batteriologia

L'allestimento dei terreni colturali secondo formule e modalità rigorosamente definite è di primaria importanza per assicurare la ripetibilità e la comparabilità dei risultati ottenuti. A questo scopo è consigliabile utilizzare i terreni forniti in forma disidratata, in polvere o in granuli, disponibili in commercio. Essi sono meno soggetti a modificazioni nella composizione rispetto a quelle che possono verificarsi quando si vengono a pesare i singoli ingredienti. In più, oltre a fornire una maggiore uniformità nella composizione, vengono anche ridotti significativamente i tempi ed i costi di preparazione.
In generale, vengono utilizzati terreni a formulazione completa. In alcuni casi, tuttavia, vengono forniti terreni-base da integrare al momento della preparazione con l'aggiunta dei componenti mancanti (antibiotici, alcoli, ecc.).
In ogni caso la preparazione di ciascun terreno deve essere effettuata secondo specifiche indicazioni.
Recentemente si sta diffondendo anche l'uso di terreni già pronti (in piastre o tubi) e di substrati (in fiale) a cui aggiungere direttamente il campione da analizzare. In alcuni casi si tratta di terreni non riproducibili in laboratorio per la presenza di componenti specifici (es. cromogeni) non distribuiti in commercio.
I terreni forniti sotto forma disidratata rimangono stabili per tempi definiti. Alcuni componenti possono alterarsi, modificando così le caratteristiche del terreno stesso. È necessario evitare che vengano conservati in ambienti umidi, in quanto igroscopici. Anche l'imperfetta chiusura del contenitore può comportare una modifica del tenore di umidità.
Un terreno in polvere, lasciato a lungo in ambiente umido, diventa compatto o, in alcuni casi, assume una consistenza viscosa e una diversa colorazione. In ogni caso, il terreno può fornire risultati modificati in funzione delle alterazioni biochimiche subite.
Pertanto la fornitura del laboratorio di terreni disidratati dovrebbe essere rinnovata ogni anno ed in ogni caso è consigliabile rifornirsi di limitate quantità di terreno.
I terreni disidratati sono ricostituiti aggiungendo ad un quantitativo specifico di polvere uno specifico volume di acqua distillata, esente da tracce di metalli e di sostanze batteriostatiche o battericide e comunque prive di sostanze in grado di inibire la crescita di microrganismi nelle condizioni di prova. Il terreno viene sciolto agitandolo e portandolo a completa soluzione.
In alcuni casi, si può verificare l'evenienza di preparare terreni di coltura a partire dai singoli componenti. In questo caso è necessario che questi siano di buona qualità e che i terreni allestiti diano risultati analoghi a quelli ottenibili con i terreni disidratati di riferimento. Tutte le sostanze impiegate, inclusi gli zuccheri e i coloranti, dovranno possedere i necessari requisiti di qualità e di purezza che dovranno essere valutati possibilmente in prove preliminari.
I terreni preparati possono essere conservati in beuta, tubi e piastre di Petri, in un luogo a riparo dalla luce diretta e refrigerati o a temperatura ambiente. In ogni caso, lunghi tempi di conservazione possono alterare le caratteristiche del terreno e favorirne la contaminazione.
È opportuno procedere a prove di controllo di qualità dei materiali preparati seguendo specifiche procedure di seguito riportate.
Per terreni di coltura disidratati e reattivi (coloranti, additivi, soluzioni) reperibili in commercio, è necessario apporre sulle confezioni sia la data di ricevimento che quella di effettiva apertura.
Quando i reagenti e i terreni sono preparati in laboratorio per pesata dai costituenti di base, devono essere identificati con una etichetta riportante informazioni quali: eventuale diluizione, data di preparazione, data di scadenza, modalità di conservazione, nome del preparatore, eventuali segnali di pericolosità.

Inoltre, si consiglia, per controllare l'affidabilità e la conformità alle specifiche richieste di effettuare i seguenti controlli:

- Controllo del pH prima della sterilizzazione. Confrontare il valore misurato mediante pH metro tarato, con quello dichiarato in etichetta e se lo scostamento è superiore a quello ammesso modificare il pH mediante aggiunte di NaOH o HCl 0,1 N. Da effettuare ad ogni preparazione del terreno.
- Controllo della sterilità. Porre ad incubare una piastra o un tubo contenenti il terreno da testare, secondo le modalità previste dal metodo analitico, e verificare la completa assenza di crescita batterica e fungina. In caso contrario scartare tutto il lotto preparato e controllare le procedure di sterilizzazione e preparazione. Da effettuare ad ogni preparazione del terreno.
- Controllo della fertilità del terreno da testare, cioè la sua idoneità alla crescita del microrganismo. Strisciare sulla superficie del terreno solido o inoculare nel brodo un'ansata di una brodocoltura allestita con un ceppo puro certificato di riferimento. Incubare con le modalità previste dal metodo analitico e verificare la crescita di colonie con le caratteristiche morfologiche tipiche. Ogni laboratorio dovrà stabilire la frequenza di controllo.
- Controllo della selettività del terreno da testare mediante l'inibizione di crescita di un microrganismo opportunamente scelto. Strisciare sul terreno solido o inoculare nel brodo un'ansata di brodocoltura allestita a partire da un ceppo puro certificato la cui crescita dovrebbe essere inibita nel substrato in esame; incubare con le stesse modalità indicate dal metodo analitico e verificare l'assenza di crescita di colonie. Ogni laboratorio dovrà stabilire la frequenza di controllo.

Per quanto riguarda i ceppi microbici di controllo per lo svolgimento delle prove di fertilità e selettività dei terreni colturali si rimanda alle indicazioni fornite dalle ditte produttrici. Tutti i controlli effettuati dovranno essere accuratamente documentati, cioè registrati ed archiviati.

6040. Attrezzature di base per le analisi microbiologiche delle acque

Per l'organizzazione di un laboratorio di microbiologia è necessario attenersi a quanto definito, in relazione all'uso delle attrezzature di laboratorio, dal D.Lgs. 626/94 che così stabilisce: "all'atto della scelta delle attrezzature, il datore di lavoro prende in considerazione: le condizioni e le caratteristiche specifiche del lavoro da svolgere; i rischi presenti nell'ambiente di lavoro; i rischi derivanti dall'impiego delle attrezzature stesse". Ciò implica pertanto che prima dell'acquisto di qualsiasi apparecchiatura debba essere definito il posizionamento, all'interno del laboratorio, della strumentazione da acquistare. Dovrà essere pertanto valutato che lo spazio e la collocazione assegnati allo strumento siano idonei per l'esecuzione delle Procedure Operative Standard; le condizioni ambientali (temperatura, umidità, insolazione) e al contorno (es. presenza di vibrazioni) siano adeguate e siano rispettate le norme di sicurezza sia in rapporto ad eventuali rischi ambientali (diffusione di bioaerosol e polveri, di sostanze tossiche), sia in relazione alle strutture e agli impianti.
Le apparecchiature di prova, in dotazione ad un laboratorio di microbiologia, devono garantire affidabilità di funzionamento e di risposta, in modo da non alterare l'accuratezza e la precisione del risultato finale della prova. Pertanto dovranno essere sempre tenute in perfetta efficienza e installate in locali che garantiscano adeguata protezione da deterioramento; questa efficienza sarà garantita da opportune disposizioni per la manutenzione e la taratura.
Per ogni apparecchiatura dovrà essere prevista una apposita Scheda che dovrà riportare tutte le informazioni utili sulla provenienza, l'acquisto, l'installazione, il collaudo, le date di ricevimento e messa in funzione, i riferimenti alle procedure di taratura e manutenzione quando necessari, la loro periodicità e i dati del fornitore e dell'assistenza tecnica.
Dovrà essere predisposta inoltre una Scheda di Manutenzione che riporti tutte le operazioni effettuate di verifica, sostituzioni, pulizia e riportare le date di effettuazione e la firma del tecnico che ha effettuato le operazioni.
Dovrà essere prevista inoltre una Scheda di Taratura su cui verrà riportato il riferimento alla procedura di taratura, il programma di taratura, la data di effettuazione della stessa e della futura taratura, la firma del tecnico e i riferimenti ai campioni primari o materiali di riferimento utilizzati per l'effettuazione della stessa.
Qualora la taratura venga effettuata da un centro esterno dovrà essere riportata tutta la documentazione inerente.
Qualora un'apparecchiatura, che a seguito di taratura abbia rilevato una non attendibilità al suo utilizzo, dovrà essere messa fuori servizio apponendo un'etichetta con la data e la dicitura "Fuori servizio". L'apparecchiatura non potrà essere in nessun modo utilizzata fino a riparazione o a taratura che dimostri il rientro nelle condizioni di normalità. Tutto quanto sopra dovrà essere riportato sulla scheda di taratura.
Di seguito vengono indicate e descritte alcune attrezzature di uso più comune nei laboratori per l'analisi microbiologica delle acque.

1. Apparecchiature per la misura del pH

Il pH dei terreni di coltura e delle soluzioni può essere determinato per via colorimetrica con l'uso di appropriati indicatori (quando non vi siano interferenze provocate dal colore del terreno) effettuando la lettura con l'impiego di comparatori muniti degli appositi dischi o con altro dispositivo appropriato. Tuttavia, le determinazioni possono essere effettuate con più precisione e speditamente per via potenziometrica con l'uso di pH metri che devono avere una precisione di misura di ±0,1 unità di pH a circa 20°C.

2. Apparecchi per sterilizzazione

2.1 Autoclavi

La sterilizzazione a vapore saturo sotto pressione (per terreni di coltura, bottiglie da prelievo, attrezzature filtranti, ecc.) richiede l'impiego di autoclavi di capacità adeguate al materiale da sterilizzare che non dovrà essere eccessivamente ammassato. La sterilizzazione di norma si effettua alla temperatura di 121±3°C (1,1 atmosfera di pressione relativa) per un tempo di 15±1 minuti.
Per il corretto uso dell'autoclave attenersi scrupolosamente alle indicazioni del costruttore.

2.2 Stufe a secco

Le stufe devono consentire il raggiungimento della temperatura di +170±10°C per circa 2 ore. È necessario che siano corredate di un termometro a gambo lungo, di precisione accettabile nell'intervallo fra 160° e 180°C e di un idoneo sistema di termoregolazione. È altresì opportuno che siano fornite di un sistema di interruttore a tempo che consenta di programmare il tempo di sterilizzazione.

2.3 Lampade a raggi UV

I sistemi di sterilizzazione con raggi ultravioletti (UV) sono particolarmente idonei per la sterilizzazione dell'ambiente sotto cappa o per piccoli locali. È da tenere presente che la vita media di una lampada a UV è di circa 5000 ore e che comunque è necessario effettuare, per mantenerne l'efficacia, una sua manutenzione periodica.
L'uso richiede precauzioni per evitare danni agli occhi e alla pelle degli operatori.

3. Attrezzature per l'incubazione

3.1 Armadi termostatici, camere termostatiche e termostati

Dovranno garantire la stabilità della temperatura d'incubazione prefissata e assicurare nei vari scomparti una temperatura costante, entro limiti di variazione non eccedenti ±1°C. Sono preferibili gli armadi termostatici a camicia d'acqua. Sia gli armadi termostatici che le camere termostatiche e i termostati dovranno essere muniti di un doppio sistema di termoregolazione, uno per il mantenimento della temperatura di esercizio e l'altro regolato ad una temperatura lievemente superiore (temperatura massima di sicurezza) che non dovrà mai essere superata.
Di norma vengono utilizzati incubatori regolabili da temperatura ambiente a 80°C. Per temperature intorno ai 20°C sono comunque da utilizzare frigotermostati. Essi devono garantire la temperatura di incubazione prevista dal metodo analitico.
È opportuno che queste apparecchiature siano provviste inoltre di termometri per il controllo visivo della temperatura, con una scala che consenta la lettura di 1°C, o di un display e, possibilmente, di un sistema termometrico di registrazione.
Gli armadi termostatici di notevoli dimensioni e le camere termostatiche dovranno essere muniti di un idoneo sistema di circolazione dell'aria che consenta il mantenimento della temperatura richiesta in tutti i punti del vano.
È altresì opportuno che queste apparecchiature siano dotate di un sistema che consenta il mantenimento di un livello di umidità compreso fra il 75 e l'80%. Ciò può essere ottenuto anche con un recipiente contenente acqua, collocato sul fondo.
Il materiale posto ad incubare dovrà essere disposto in modo da consentire la circolazione del calore e non essere eccessivamente ammassato.

3.2 Bagni termostatici

Dovranno garantire la stabilità della temperatura d'incubazione prefissata ed essere provvisti di un doppio sistema di controllo della temperatura costituito da un sistema di esercizio e l'altro regolato ad una temperatura superiore (temperatura di sicurezza) che non dovrà mai essere superata. Dovranno inoltre essere provvisti di termometri per il controllo visivo della temperatura e possibilmente di un sistema termometrico di registrazione ed eventualmente di un idoneo sistema di agitazione dell'acqua. Per il loro riempimento è necessario utilizzare acqua distillata che deve essere comunque rinnovata regolarmente. Per evitare fenomeni di corrosione è opportuno utilizzare filiere o idonei cestelli di acciaio inossidabile o di materiale plastico idoneo. L'eventuale sviluppo di alghe o di funghi nell'acqua deve essere eliminato mediante l'uso di composti ammonici quaternari da fare agire per circa 24 ore, provvedendo poi allo svuotamento, risciacquo e successivo riempimento con acqua distillata.

4. Bilance

In laboratori attrezzati per l'esecuzione di indagini microbiologiche può essere sufficiente disporre di bilance che permettono di pesare quantità intorno a 150 g con risoluzione di 0,1 g. Per la pesata di additivi, reagenti, coloranti ecc., è necessario disporre di una bilancia analitica con risoluzione di 0,1 mg.

5. Cappe a flusso laminare

Per garantire la qualità del dato analitico e la protezione dell'operatore devono essere utilizzate cappe di sicurezza. Di norma, per eseguire analisi microbiologiche ambientali che prevedano la ricerca di microrganismi a rischio basso o moderato (gruppi 2 e 3 del D.Lgs. 626/94) vengono utilizzate cappe a flusso laminare di classe II A. Sono cappe a flusso verticale, aperte frontalmente e progettate per la protezione dell'operatore, del prodotto al suo interno e dell'ambiente circostante.
Le cappe biologiche devono essere collocate in locali esenti da correnti d'aria e lontane da impianti di condizionamento e finestre.

6. Centrifughe

Possono essere utilizzate centrifughe da banco e da terra con rotori ad inclinazione fissa o variabile. Possono essere refrigerate o meno in base alle necessità. È necessario utilizzare centrifughe realizzate secondo le norme di sicurezza internazionali.

7. Frigoriferi e congelatori

Frigoriferi e congelatori devono avere un dispositivo di rilevazione della temperatura e impiegare per il controllo interno un termometro a minima e a massima oppure un termometro con bulbo immerso in glicerolo.
I frigoriferi devono assicurare una temperatura di circa +4°C ed i congelatori da utilizzare possono essere quelli che raggiungono temperature intorno a -20°C e a -70°C.

8. Membrane filtranti e apparecchiature per filtrazione

8.1 Membrane filtranti

Le membrane filtranti per uso batteriologico sono costituite da dischi di esteri di cellulosa con

pori uniformemente distribuiti. Generalmente per le analisi microbiologiche si utilizzano membrane con pori aventi un diametro di 0,45 µm (±0,02 µm). A causa della loro porosità hanno la capacità di trattenere sulla loro superficie, all'atto della filtrazione, i batteri contenuti nell'acqua che svilupperanno colonie sulla superficie della membrana, dopo un idoneo periodo di incubazione, per passaggio per capillarità dei principi del terreno colturale.
Esistono in commercio membrane filtranti di vario diametro. Per l'esame batteriologico delle acque vengono normalmente utilizzate membrane del diametro di 47-50 mm.
In commercio si trovano confezioni già sterili pronte per l'uso, in genere sterilizzate con raggi gamma o con ossido di etilene.
Le membrane si differenziano a seconda della ditta di produzione. Problemi si possono verificare in relazione al tipo di membrane utilizzate: inibizione batterica in corrispondenza della linea del reticolo, sciamamento delle colonie, crescita lungo la linea del reticolo, presenza di zone idrofobiche. Per evitare, pertanto, l'uso di membrane non idonee, sarebbe consigliabile verificarne l'efficienza prima delle analisi.

8.2 Apparecchiature per la filtrazione

Nel caso dell'esame batteriologico delle acque, vengono di norma utilizzate apparecchiature idonee per la filtrazione di piccoli volumi. Dette apparecchiature devono essere adatte per l'impiego di membrane filtranti del diametro di 47-50 mm. Sono costituite da una rampa con supporti e contenitori che possono essere in acciaio inossidabile, vetro, policarbonato o polipropilene. Possono essere impiegate apparecchiature singole o in serie, utilizzando, come sistema aspirante, una pompa da vuoto azionata elettricamente o una pompa ad acqua. È essenziale che fra sistema filtrante e sistema aspirante sia interposto un idoneo sistema per la raccolta dell'acqua filtrata.
I supporti e i contenitori devono essere sterilizzati in autoclave a 121±3°C per 15±1 minuti (pressione 1,1 atm); dopo accurato lavaggio ed asciugatura e prima della sterilizzazione devono essere avvolti in carta idonea per mantenere la sterilità durante la conservazione prima dell'uso. Possono essere utilizzati entro due settimane dalla sterilizzazione, se conservati in condizioni ottimali.
Apparecchiature per il supporto di membrane di diametro più grande (ad esempio, 120 mm), in genere di acciaio inossidabile, sono utilizzate per filtrazioni di volumi maggiori di acqua.

9. Microscopio ottico

Per le normali procedure di analisi microbiologica (es. colorazione di Gram) è sufficiente disporre di un microscopio ottico con obiettivi 10, 40 e 100X, vetrini portaoggetto e coprioggetto e olio ad immersione. Dopo ogni utilizzo rimuovere il residuo di olio sulle lenti con carta ottica.

10. Sistemi per anaerobiosi

Consistono in giare, cappe o altri sistemi a tenuta, idonei a creare aree a composizione gassosa controllata. Le condizioni di anaerobiosi devono essere verificate con appositi dispositivi.
Per il loro corretto uso attenersi scrupolosamente alle indicazioni della ditta produttrice.

11. Vetreria e materiale monouso

È da preferire la vetreria fabbricata con vetro neutro, resistente alle temperature di sterilizzazione. Prima della sterilizzazione (da effettuare in stufa a secco alla temperatura di circa 180°C per 1 ora e mezzo o in autoclave a 121±3°C per 15±1 minuti) la vetreria deve essere accuratamente lavata in modo da assicurare la completa eliminazione di residui organici

o di sostanze che possono esplicare azione antibatterica. Dopo lavaggio e asciugatura la vetreria, per essere sterilizzata deve essere confezionata in modo idoneo a consentire il mantenimento della sterilità durante la conservazione.
Negli ultimi anni si è andato sempre più diffondendo l'uso di materiali plastici monouso, forniti in confezioni già sterili. Il vantaggio di usare questi materiali è legato soprattutto al risparmio di manodopera impiegata nelle lunghe procedure di lavaggio, confezionamento e sterilizzazione dei materiali in vetro. I materiali plastici da usare nel laboratorio batteriologico devono però essere esenti da residui tossici della lavorazione, essere trasparenti ed avere segni di taratura che corrispondano a precise indicazioni volumetriche.
Esistono in commercio anche articoli in materiale plastico che possono essere utilizzati e sottoposti a ripetute sterilizzazioni in autoclave.

11.1 Bottiglie per il prelievo

Possono essere di vetro neutro, resistenti alla sterilizzazione, da chiudere con tappo smerigliato o con idoneo tappo a vite. Prima della sterilizzazione, le bottiglie con tappo smerigliato debbono essere provviste di un cappuccio di copertura in carta resistente ed impermeabile o in foglio di alluminio. Tale tipo di protezione non è richiesto per le bottiglie munite di tappo a vite. Per il campionamento possono essere anche utilizzate bottiglie monouso in materiale plastico, disponibili in commercio già sterili, in genere in confezioni multiple.

11.2 Bottiglie e tubi per diluizione, beute, cilindri tarati

È da utilizzare preferibilmente materiale in vetro, resistente alla sterilizzazione.
Le bottiglie e i tubi per diluizione dovranno essere provvisti di tappo smerigliato, a scatto, di gomma o a vite. Possono essere impiegate anche bottiglie (o tubi) di plastica, fabbricate con materiale idoneo e non tossico, e resistenti alla sterilizzazione in autoclave.

11.3 Pipette e micropipette

Per le varie operazioni di analisi occorrono pipette di varia capacità (da 1 mL, da 5 mL e da 10 mL) graduate fino alla punta, con suddivisione a 0,1 mL.
Sono disponibili in commercio confezioni di pipette monouso in materiale plastico, di varia misura, già sterili. Per piccoli volumi possono essere comunque utilizzate micropipette manuali, elettroniche, monocanale o multicanale da utilizzarsi con appositi puntali monouso.
Nell'eventualità si utilizzino pipette di vetro riutilizzabili, prima della sterilizzazione, esse dovranno essere munite di filtro di cotone grezzo all'estremità superiore. Le pipette vanno sterilizzate in confezione singola o multipla (in apposite custodie in metallo, preferibilmente acciaio inossidabile, o in vetro).
Non pipettare con la bocca, ma utilizzare sempre sistemi di aspirazione tipo pompette aspiranti a bulbo di gomma o pipettatrici automatiche.

11.4 Tubi per coltura

I tubi vengono usati per la tecnica dei tubi multipli, per l'esecuzione di "test" biochimici, per la conservazione di colture batteriche, ecc. Si utilizzano tubi di diverse dimensioni in relazione all'utilizzo. I tubi devono essere chiusi utilizzando preferibilmente tappi in metallo, in materiale plastico o in cotone grezzo. Sono da preferire i tubi in vetro resistente alla corrosione ed alla sterilizzazione.

11.5 Piastre di Petri

L'uso delle piastre di Petri è indispensabile per l'isolamento di colture batteriche e per l'analisi effettuata con la tecnica della filtrazione su membrana. Vengono utilizzate piastre di Petri di varie dimensioni. Il tipo più diffuso ha un diametro di circa 100 mm ed un'altezza di 15 mm. Per la filtrazione dell'acqua, poiché la tecnica standardizzata prevede l'utilizzo di mem-

brane di 47 mm di diametro, si possono usare piastre di diametro anche di 50 mm e dello spessore di 12 mm.
Piastre di Petri in vetro sono state usate per lungo tempo in batteriologia. Negli ultimi anni esse sono state quasi totalmente sostituite da piastre monouso, in materiale plastico che si trovano in commercio già sterili in confezioni sigillate.
Indipendentemente dal materiale (vetro o plastica) le piastre di Petri devono essere con il fondo perfettamente piano e perfettamente trasparenti al fine di rendere ottimale il riconoscimento delle colonie.

7000 - METODI PER LA DETERMINAZIONE DI MICROORGANISMI INDICATORI DI INQUINAMENTO E DI PATOGENI

7000. Metodi per la determinazione di microorganismi indicatori d'inquinamento e di patogeni

Dalla difficoltà di utilizzare tecniche di routine finalizzate alla ricerca di tutti i possibili organismi patogeni, è sorta la necessità di ricercare, per la definizione della qualità di un'acqua, microrganismi indicatori di contaminazione, la cui presenza può essere considerata indice della presenza di patogeni. L'uso degli indicatori tuttavia fornisce la probabilità, e non la certezza, della presenza di patogeni. I microrganismi storicamente proposti come indicatori di inquinamento fecale nell'ambiente e che vengono ricercati, comunemente e su base normativa, per la definizione della qualità di acque di diversa tipologia e a diversa destinazione d'uso sono i Coliformi Totali, i Coliformi Fecali (di cui fa parte *Escherichia coli*) e gli Streptococchi Fecali. Negli anni più recenti, l'approfondimento degli studi e delle ricerche ha tuttavia orientato l'interesse su altri gruppi di indicatori o specie microbiche più significativi: enterococchi ed *Escherichia coli* sono attualmente ritenuti più validi indicatori di contaminazione fecale e parametri che, meglio di altri, possono segnalare la eventuale presenza di patogeni. In Tab. 3 vengono suggeriti alcuni volumi iniziali per l'analisi di acque naturali di diversa tipologia per il rilevamento quantitativo degli indicatori di contaminazione fecale.

Tabella 3: Volumi proposti per l'analisi di acque di diversa tipologia per il rilevamento quantitativo degli indicatori di contaminazione fecale

Tipo di acqua	Volumi (mL)				
	10	1	0,1	0,01	0,001
Sorgente	x				
Lago	x	x			
Torrente		x	x		
Fiume		x	x		
Refluo					
clorata		x	x		
trattam. secondario		x	x	x	
trattam. primario			x	x	
grezza				x	x

La ricerca dei patogeni deve essere effettuata, rispetto agli indicatori, su quantitativi più elevati di acqua, ma, mentre il loro rilevamento testimonia ovviamente della loro sicura presenza, un risultato negativo non depone per la loro sicura assenza. Infatti i patogeni possono essere presenti con discontinuità negli effluenti e conseguentemente nei corpi idrici riceventi; in aggiunta, l'abbondante presenza di flora contaminante accessoria interferisce spesso con la reale possibilità di evidenziare i patogeni anche quando essi siano presenti. Pertanto, a causa della discontinuità della loro presenza e delle difficoltà tecniche legate al loro isolamento nell'ambiente idrico, la ricerca dei patogeni non potrà tanto avere il significato di controllare la qualità delle acque, quanto finalità epidemiologiche, offrendo la possibilità di individuare uno degli anelli della catena attraverso la quale avviene la diffusione degli agenti patogeni responsabili delle malattie infettive di origine idrica.
Di seguito vengono presentati i metodi di analisi per la ricerca sia di indicatori di contaminazione fecale (coliformi, streptococchi ed *Escherichia coli*) e di qualità (conteggio delle co-

lonie su agar), sia di alcuni organismi che producono forme di resistenza (spore di clostridi solfito-riduttori, uova di Elminti), di patogeni e opportunisti patogeni di natura batterica (*Salmonella*, *Vibrio* e *Aeromonas*), batteriofagi, virus e protozoi patogeni.
I metodi proposti per i diversi parametri microbiologici considerati sono stati elaborati in rispetto delle più recenti acquisizioni tecnico-scientifiche e degli aggiornamenti che in questi anni sono stati segnalati a livello nazionale ed internazionale. Sono pertanto stati inseriti metodi analitici che, sperimentati ampiamente in laboratorio e facenti parte di protocolli operativi per la ricerca dei parametri microbiologici presi in considerazione, erano già stati proposti da enti ed organizzazioni internazionali quali ISO, APHA, USEPA, AOAC, PHLS, WHO. Alcuni di essi fanno già parte di una serie di metodi di riferimento proposti a livello nazionale dall'Istituto Superiore di Sanità, dall'IRSA e dal Ministero delle Politiche Agricole e Forestali. Ancora, alcuni sono stati sottoposti a prove di comparazione tra metodi anche nell'ambito di circuiti interlaboratoriali svolti a livello europeo.
Per quanto riguarda le attrezzature di laboratorio, le tecniche di campionamento e quelle di analisi più generali, si fa riferimento alle Sezioni 6020, 6030 e 6040.

7010. Coliformi totali

1. Introduzione

1.1 Generalità

Nel gruppo dei coliformi totali vengono compresi microrganismi che fanno parte della famiglia delle *Enterobacteriaceae*. L'appartenenza a questa famiglia da parte di generi differenti, più che sulle caratteristiche sistematiche dei diversi microrganismi, si è basata storicamente sul metodo utilizzato per il loro rilevamento che sfrutta la loro capacità di fermentare il lattosio con produzione di gas e acido alla temperatura di 35°-37°C in 48 ore. I coliformi totali sono batteri a forma di bastoncello, gram negativi, aerobi ed anaerobi facoltativi, non sporigeni. Sono considerati, insieme ai coliformi fecali e agli streptococchi, classici indicatori di contaminazione nelle acque. Pur essendo presenti nel materiale fecale di origine umana con una densità media di 10^9 UFC/g, sono ubiquitari. Proprio a causa della loro costante presenza nell'ambiente, la loro validità come indicatori è stata più volte messa in dubbio. Le più recenti indicazioni, in fase comunque di ulteriore evoluzione, tendono a distinguere i microrganismi appartenenti al gruppo in due principali categorie che, in base alle specie, e non più al genere, differenziano coliformi di origine fecale e coliformi di origine acquatica e tellurica, naturalmente presenti nelle acque al di là di qualsiasi contaminazione. La prima categoria, ben conosciuta, è quella dei coliformi di riconosciuta origine fecale che comprende alcune specie dei generi *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, presenti nel materiale fecale dell'uomo e degli animali a sangue caldo e in acque e suoli contaminati. La seconda categoria corrisponde a specie che, al contrario, sono largamente distribuite nell'ambiente, dove possono anche moltiplicarsi, colonizzando suolo, acqua e vegetazione.
Nelle acque reflue grezze le loro concentrazioni possono raggiungere valori compresi tra 10^7-10^9 per 100 mL di campione.

1.2 Obiettivo

Il metodo consente di valutare, in un volume noto di acqua, la concentrazione dei microrganismi appartenenti al gruppo dei coliformi totali.

1.3 Principio del metodo

La procedura analitica si basa sul conteggio dei microrganismi presenti in un volume noto del campione di acqua.
Possono essere utilizzate due tecniche analitiche:

- *Metodo A:* metodo del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN). Con questo metodo, che consiste in una prova presuntiva e in una prova di conferma, viene calcolata la densità dei coliformi totali in campioni di acqua tramite una stima statistica determinata sulla base della combinazione di tubi positivi e negativi ottenuti inoculando aliquote del campione in terreno colturale liquido. Il risultato può essere ricavato, in base alle diverse combinazioni, dall'apposita tabella già predisposta (Tab. 1, Sezione 6020). Di seguito viene riportata la descrizione del metodo e vengono indicati, per la prova presuntiva, due terreni di coltura alternativi che si basano sulla fermentazione del lattosio.
- *Metodo B:* metodo della filtrazione su membrana (MF). Questo metodo per-

mette di contare il numero delle colonie cresciute su una membrana posta su terreno colturale agarizzato. Di seguito viene riportata la descrizione del metodo e vengono indicati tre substrati alternativi.

1.4 Campo di applicazione

La procedura analitica viene utilizzata per acque superficiali, di fiume, di lago e per acque reflue anche sottoposte a trattamento.

2. METODO A. Metodo del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN)

Con questo metodo viene calcolata la densità dei coliformi totali in campioni di acque tramite la formula probabilistica che definisce il numero più probabile di batteri coliformi necessario a produrre combinazioni di tubi positivi e negativi in repliche di diluizioni decimali. Il metodo è particolarmente adatto per l'esame di acque che presentano un'elevata torbidità.

2.1 Volume da analizzare

Per l'analisi è necessario determinare il volume in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare. Per acque reflue o comunque di bassa qualità generalmente è necessario analizzare diluizioni scalari del campione; mentre per acque già sottoposte a trattamento possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

3. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

4. Reattivi e terreni di coltura

4.1 Brodi per lo svolgimento della prova presuntiva

4.1.1 Brodo Lattosato

Composizione:

Estratto di carne	3	g
Peptone	5	g
Lattosio	5	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 6,9±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere e prima della sterilizzazione, distribuire il terreno in tubi contenenti la campanella di Durham in posizione rovesciata. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 2 settimane a temperatura ambiente in condizioni ottimali.

4.1.2 Brodo al Lauril Triptosio

Il terreno può essere utilizzato in alternativa al Brodo Lattosato (4.1.1). Si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere e prima della sterilizzazione, distribuire il terreno in tubi contenenti la campanella di Durham in posizione rovesciata. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 2 settimane a temperatura ambiente in condizioni ottimali.

Composizione:

Triptosio	20	g
Lattosio	5	g
Dipotassio idrogeno fosfato	2,75	g
Potassio diidrogeno fosfato	2,75	g
Sodio cloruro	5	g
Sodio lauril solfato	0,1	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 6,8±0,2		

4.2 Brodo per lo svolgimento della prova di conferma

4.2.1 Brodo Lattosato Bile Verde Brillante

Composizione:

Peptone	10	g
Lattosio	10	g
Bile	20	g
Verde brillante	13,3	mg
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,2±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere e prima della sterilizzazione, distribuire il terreno nei tubi contenenti la campanella di Durham rovesciata. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 2 settimane a temperatura ambiente in condizioni ottimali.

5. Procedura

5.1 Prova presuntiva

Prima di procedere all'inoculo di aliquote scalari del campione nei tubi del brodo per la prova presuntiva (4.1.1 o 4.1.2), agitare vigorosamente il campione per assicurare una distribuzione omogenea dei microrganismi sospesi nell'acqua. Dopo l'inoculo agitare leggermente i tubi e procedere all'incubazione in termostato entro 30 minuti. Incubare a 36±1°C. Dopo 24±2 ore agitare ciascun tubo per verificare la formazione di gas nella campanella ed eventualmente reincubare per altre 24 ore. Alla fine del periodo di incubazione registrare i risultati in base alla disposizione dei tubi che presentano produzione di gas ed intorbidimento del brodo. La produzione di gas entro le 48±3 ore costituisce una reazione positiva presuntiva: sottoporre alla prova di conferma i tubi risultati positivi.

5.2 Prova di conferma

Prelevare, sterilmente, 0,1 mL di brodocoltura dai tubi positivi del brodo per la prova presuntiva (formazione di gas entro le 48 ore) ed inoculare nei corrispondenti tubi contenenti il Brodo lattosato bile verde brillante (4.2.1) per la prova di conferma. Incubare i tubi a 36±1°C per 24+24 ore. Alla fine del periodo di incubazione, la formazione di gas nelle campanelle costituisce una reazione positiva per i coliformi totali.
Annotare i risultati ottenuti indicando il numero di tubi positivi e negativi e, sulla base delle combinazioni ottenute, consultando la Tab. 1 (vedi Sezione 6020), calcolare, considerando l'eventuale diluizione, il valore dell'indice MPN.

6. Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come valore MPN/100 mL di campione.

7. Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero più probabile di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

8. METODO B. Metodo del numero più probabile (MPN)

Il metodo di seguito descritto viene riportato nel Manuale "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" sotto il nome di Enzyme Substrate Test. L'EPA ha approvato questo tipo di analisi sotto il nome di MMO-MUG test (Colilert). L'AOAC ha inserito il metodo analitico in "Official Methods of Analysis" con il nome di "Defined Substrate Technology" (Colilert).
Recentemente la performance del metodo è stata valutata, anche in Italia, durante lo svolgimento di un circuito interlaboratoriale di confronto tra metodi con la collaborazione di diversi laboratori europei.
È applicabile all'analisi di acque poco e mediamente contaminate, anche oligotrofe, clorate e comunque contenenti coliformi totali danneggiati. È di facile e rapido impiego.

8.1 Principio del metodo B

Il prodotto è già disponibile in commercio sotto forma di kit completo per l'inoculo del campione, utilizzabile in tubi e piastre multi-pozzetto, monouso, per lo svolgimento della tecnica del numero più probabile (MPN). Dopo un periodo di incubazione di 18 o 24 ore a 36±1°C si procede alla lettura dei risultati: i pozzetti positivi per la presenza di coliformi totali hanno virato al giallo. I risultati sono espressi come numero più probabile o Most Probable Number (MPN) per 100 mL di campione.

8.2 Volume da analizzare

Il volume da analizzare per qualsiasi tipologia di acque è 100 mL, sia che si tratti del campione tal quale, sia di una sua diluizione, quest'ultima da determinare comunque in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare.

8.3 Strumentazione e vetreria

Per lo svolgimento dell'analisi oltre alla normale attrezzatura di laboratorio sono necessari:

- sigillatore automatico.

8.4 Reattivi e terreni di coltura

Composizione:

Ammonio solfato	5	g
Manganese solfato	0,5	mg
Zinco solfato	0,5	mg
Magnesio solfato	100	mg
Sodio cloruro	10	g
Calcio cloruro	50	g
Sodio solfito	40	g
Amfotericina B	1	mg
O-nitrofenil-ß-D-galattopiranoside	0,5	g
4-metilumbellifenil-ß-D-glucuronide	75	mg
Solanium	0,5	g
Hepes buffer		
Sali di sodio	5,3	g
Acido organico	6,9	g

8.4.1 Defined Substrate Technology (Colilert)

Il terreno disidratato viene distribuito in commercio in fiale già predosate per l'esame di 100 mL di campione o di una sua diluizione. Il kit fornisce la possibilità di leggere i risultati dopo 18 o 24 ore.

8.5 Procedura

Seguendo le istruzioni della ditta produttrice, mescolare in un flacone sterile il terreno disidratato (8.4.1) con 100 mL di campione o di una sua diluizione. Chiudere il flacone e mescolare per sciogliere completamente il terreno. Attendere che l'eventuale formazione di schiuma sia sparita e versare il contenuto del flacone nella piastra sterile a 51 pozzetti o in quella a 97 pozzetti. Sigillare la piastra inoculata con l'apposito sigillatore automatico (8.3) che provvede anche alla distribuzione del campione all'interno dei pozzetti.

8.5.1 Incubazione

Incubare a 36±1°C entrambi i tipi di piastre per un periodo di 18 ore per Colilert 18 e di 24 ore per Colilert.

8.5.2 Lettura e interpretazione dei risultati

I pozzetti che hanno virato al giallo sono considerati positivi per i coliformi totali. Senza diluizioni la piastra a 51 pozzetti permette la lettura da 1 a 200 microrganismi/100 mL; la piastra a 97 pozzetti permette la lettura da 1 a 2419 microrganismi/100 mL.

8.6 Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come valore MPN/100 mL di campione.
I valori dell'indice MPN sono calcolati in base alla tabella specifica fornita con il kit di analisi.

8.7 Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero più probabile di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

9. METODO C. Metodo della filtrazione su membrana (MF)

Con questo metodo viene calcolata la concentrazione dei coliformi totali che, presenti in un campione di acqua, sulla superficie di una membrana, posta su terreno di coltura agarizzato, hanno formato colonie tipiche prodotte dai microrganismi ricercati. Di seguito vengono proposti tre substrati di isolamento alternativi.

9.1 Volume da analizzare

Per l'analisi è necessario determinare il volume in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare. Per acque reflue o comunque di bassa qualità generalmente è necessario analizzare diluizioni scalari del campione; mentre per acque già sottoposte a trattamento possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

9.2 Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

10. Reattivi e terreni di coltura

10.1. Terreni di isolamento

10.1.1 m-Endo agar (Les)

Composizione:

Estratto di lievito	1,2	g
Casitone	3,7	g
Tiopeptone	3,7	g
Triptosio	7,5	g
Lattosio	9,4	g
Potassio diidrogeno fosfato	1,0	g
Dipotassio idrogeno fosfato	3,3	g
Sodio cloruro	3,7	g
Sodio desossicolato	0,1	g
Sodio lauril solfato	0,05	g
Sodio solfito	1,6	g
Fucsina basica	0,8	g
Agar	15,0	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,2±0,2		

Il metodo che utilizza questo substrato è riportato nelle normative nazionali che richiedono la determinazione del parametro coliformi totali per la valutazione della qualità delle acque; pertanto viene necessariamente inserito tra i metodi proposti.

Nota: *il terreno è classificato come Xn - Nocivo. La scheda di sicurezza, a cui è necessario fare riferimento, informa che la presenza di fucsina basica (Magenta I) comporta la possibilità di effetti irreversibili (R40) e il prodotto può presentare un rischio di cancerogenesi (categoria 1). Il suo utilizzo richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione: protezione respiratoria (mascherina antipolvere, o uso di cappa aspirante), protezione delle mani (guanti protettivi), protezione della pelle (indumenti protettivi).*

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Non si sterilizza. Dopo avere sciolto la polvere in 1 L di acqua distillata contenente 20 mL di etanolo al 95%, si distribuisce in capsule di Petri. È preferibile pre-

parare il terreno al momento dell'uso e comunque, una volta preparato, mantenerlo al riparo dalla luce.
L'uso di questo substrato può comportare che coliformi danneggiati dai trattamenti che l'acqua ha subito non vengano rilevati e può permettere la crescita di microrganismi diversi da quelli ricercati. Pertanto può accadere che colonie rosse tipiche non siano formate da microrganismi appartenenti al gruppo dei coliformi totali, così come colonie atipiche possano originare da batteri coliformi. Pertanto, è consigliabile, qualora sorgano dubbi sulla natura delle colonie, sottoporre le colonie sospette a prove di conferma.

10.1.2 C-EC Agar

Composizione:

Triptosio	10	g
Triptofano	1	g
Peptocomplesso	5	g
Estratto di lievito	3	g
Sodio cloruro	5	g
Sali di bile n. 3	1,5	g
IPTG	0,1	g
5-Br-4Cl-3-indolil-D-galattopiranoside	0,08	g
4-metilumbelliferil-ß-D-glucuronide	0,05	g
Agar Bios LL	13	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 6,8±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere sterilizzare a 115±1°C per 15±1 minuti. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

10.1.3 Chromogenic E.coli/Coliform Medium

Composizione:

Miscela cromogenica	20,3	g
Estratto di lievito	3	g
Peptone	5	g
Lattosio	2,5	g
Sodio cloruro	5	g
Sodio fosfato monoacido	3,5	g
Potassio fosfato biacido	1,5	g
Rosso neutro	0,03	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 6,8±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.
Il terreno è adatto per la determinazione dei coliformi totali in acque con basse densità di microrganismi interferenti.

10.2 Substrato di crescita

10.2.1 Agar soia triptone

Composizione:

Triptone	15	g
Peptone di soia	5	g
Sodio cloruro	5	g
Agar	20	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,2±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere, sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

10.3 Reattivo alla Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato

10.3.1 Soluzione di Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato all'1%

Composizione:

N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato	1	g
Acqua distillata	100	mL

Dischetti o tamponi adatti all'uopo sono anche disponibili in commercio; in alternativa sciogliere N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato in acqua distillata, preparando la soluzione al momento dell'uso.

Nota: *è da segnalare che tale prodotto viene classificato come sostanza pericolosa per la salute ai sensi della direttiva 67/548/CEE e successivi adeguamenti.*

11. Procedura

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa con porosità di 0,45 µm di diametro. Porre la membrana sulla superficie del substrato di isolamento e procedere all'incubazione a 36±1°C per 18-24 ore.

11.1 Lettura dei risultati

Dopo incubazione, sul terreno m-Endo Agar (Les) (10.1.1) la lettura dei risultati deve essere effettuata al più presto allo scopo di evitare che la luce provochi alterazioni cromatiche delle colonie cresciute.
Sono da considerare coliformi totali le colonie cresciute entro le 24 ore, di colore rosso con riflesso verde metallico.
Sul C-EC Agar (10.1.2) sono considerate coliformi totali le colonie di colore verde-blu cresciute entro le 24±2 ore.
Sul substrato Chromogenic *E. coli*/Coliform Medium (10.1.3) sono considerate coliformi totali le colonie di colore rosa cresciute entro le 24±2 ore.
È possibile procedere, per la verifica dell'appartenenza alla famiglia delle Enterobatteriacee, a cui il gruppo dei coliformi totali appartiene, alla prova della citocromossidasi (12.1), quale prova di conferma. Eventualmente effettuare l'identificazione delle colonie sospette utilizzando i sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica seguendo le indicazioni della ditta produttrice.

12. Conferma biochimica

12.1 Prova della citocromossidasi

Prima di effettuare la prova è necessario selezionare, isolando per striscio, le colonie sospette su Agar soia triptone (10.2.1) ed incubare a 36±1°C per 24±2 ore.
La prova permette di differenziare i microrganismi appartenenti al gruppo dei coliformi in base alla presenza dell'enzima citocromossidasi. I coliformi sono ossidasi-negativi.

13. Procedura

Prelevare, seguendo le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile la colonia cresciuta sul terreno di crescita e strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo (10.3.1) preparato al momento dell'uso o saggiare sui dischetti o con i tamponi adatti all'uopo distribuiti in commercio. Una reazione negativa (tipica dei coliformi totali) si manifesta con il mancato sviluppo di colore, mentre i microrganismi ossidasi-positivi producono una reazione che fornisce una colorazione blu-violetto entro pochi secondi.

14. Espressione dei risultati

Il numero di coliformi totali isolati si calcola in base al numero di colonie contate, ed eventualmente sottoposte a conferma, considerando la eventuale diluizione e riportando il valore come Unità Formanti Colonia per 100 mL di campione (UFC/100 mL).
Dal numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana e tenendo conto dei risultati delle prove di conferma, calcolare il numero di microrganismi presenti in 100 mL del campione in base alla seguente formula (1):

$$C = \frac{A \cdot N \cdot V_s \cdot F}{B \cdot V_t} \qquad (1)$$

dove:
C = numero di colonie che sono state confermate per 100 mL;
A = numero di colonie confermate;
B = numero di colonie da sottoporre a conferma;
N = numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana;
V_t = volume (mL) di campione analizzato;
V_s = volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 mL);
F = fattore di diluizione.

15. Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for examination of water and wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA).

BONADONNA L. (1994): "Coliformi totali sul substrato mEndo: un parametro critico nella routine delle analisi microbiologiche", *Tecnica Sanitaria*, **32**, 151-159.

HAVELAAR A.H., HEISTERKAMP S.H., HOEKSTRA J.A. & MOOIJMAN K.A. (1993): "Performance characteristics of methods for the bacteriological examination of water", *Wat. Sci. Techol. "Technol."*, **97**, 1-13.

7020. Coliformi fecali

1. Introduzione

1.1 Generalità

I coliformi fecali o termotolleranti fanno parte di quella frazione di microrganismi appartenenti alla famiglia delle Enterobatteriacee, a forma di bastoncello, gram-negativi, aerobi ed anaerobi facoltativi, non sporigeni che, in base alla definizione basata sulla tecnica della fermentazione, fermentano il lattosio con produzione di gas e acido alla temperatura di 44±1°C in 24 ore. Sono presenti nel materiale fecale ad una concentrazione media di 10^7-10^8 UFC/g e possono trovarsi nelle acque reflue grezze a una concentrazione intorno a 10^5-10^7 UFC/100 mL. La loro presenza costituisce un indice di contaminazione fecale dell'acqua esaminata.
I metodi classici per il loro rilevamento utilizzano una temperatura più elevata come fattore discriminante per distinguerli dai membri del gruppo dei coliformi di origine non fecale.

1.2 Obiettivo

Il metodo consente di valutare, in un volume noto di acqua, la concentrazione dei microrganismi appartenenti al gruppo dei coliformi fecali.

1.3 Principio del metodo

La procedura analitica si basa sul conteggio dei microrganismi presenti in un volume noto del campione di acqua.
Possono essere utilizzate due tecniche analitiche:

- *Metodo A:* metodo del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN). Con questo metodo, che consiste in una prova presuntiva e in una prova di conferma, viene calcolata la densità dei coliformi fecali in campioni di acqua tramite una stima statistica determinata sulla base della combinazione di tubi positivi e negativi ottenuti inoculando aliquote diverse del campione in terreno colturale liquido. Il risultato può essere ricavato, in base alle diverse combinazioni, dall'apposita tabella già predisposta (Tab. 1, Sezione 6020). Di seguito viene riportata la descrizione del metodo e vengono indicati, per la prova presuntiva, due terreni di coltura alternativi che si basano sulla fermentazione del lattosio.
- *Metodo B:* metodo della filtrazione su membrana (MF). Questo metodo permette di contare il numero delle colonie cresciute su una membrana posta su terreno colturale agarizzato. Esistono in commercio diversi substrati usati per l'isolamento dei coliformi fecali che garantiscono buoni risultati in fase analitica, anche se non esiste un unico substrato in grado di far crescere tutte le specie presenti. È necessario in ogni caso tenere in considerazione che la scelta di un substrato o di un altro può essere effettuata sulla base dell'esperienza dell'operatore, a condizione che ciò non comporti alcun cambiamento delle caratteristiche di produttività. Di seguito vengono proposti due substrati alternativi.

1.4 Campo di applicazione

La procedura analitica viene utilizzata per acque superficiali, di fiume, di lago e per acque reflue anche sottoposte a trattamento.

2. METODO A. Metodo del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN)

Con questo metodo viene calcolata la densità dei coliformi fecali in campioni di acque tramite la formula probabilistica che definisce il numero più probabile di batteri coliformi necessario a produrre combinazioni di tubi positivi e negativi in repliche di diluizioni decimali. Il metodo è particolarmente adatto per l'esame di acque che presentano un'elevata torbidità.

2.1 Volume da analizzare

Per l'analisi è necessario determinare il volume in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare. Per acque reflue o comunque di bassa qualità generalmente è necessario analizzare diluizioni scalari del campione, mentre per acque già sottoposte a trattamento possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

3. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

4. Reattivi e terreni di coltura

4.1 Brodi per lo svolgimento della prova presuntiva

4.1.1 Brodo Lattosato

Composizione:

Estratto di carne	3	g
Peptone	5	g
Lattosio	5	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 6,9±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere e prima della sterilizzazione, distribuire il terreno in tubi contenenti la campanella di Durham in posizione rovesciata. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 2 settimane a temperatura ambiente in condizioni ottimali.

4.1.2 Brodo al Lauril Triptosio

Composizione:

Triptosio	20	g
Lattosio	5	g
Dipotassio idrogeno fosfato	2,75	g
Potassio diidrogeno fosfato	2,75	g
Sodio cloruro	5	g
Sodio lauril solfato	0,1	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 6,8±0,2		

Il terreno può essere utilizzato in alternativa al Brodo Lattosato (4.1.1). Si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere e prima della sterilizzazione, distribuire il terreno in tubi contenenti la campanella di Durham in posizione rovesciata. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 2 settimane a temperatura ambiente in condizioni ottimali.

4.2 Brodo per lo svolgimento della prova di conferma

4.2.1 EC Medium

Composizione:

Triptosio	20	g
Lattosio	5	g
Sali di bile n. 3	1,5	g
Dipotassio idrogeno fosfato	4	g
Potassio diidrogeno fosfato	1,5	g
Sodio cloruro	5	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 6,9±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice.
Dopo avere sciolto la polvere e prima della sterilizzazione, distribuire il terreno in tubi contenenti la campanella di Durham in posizione rovesciata. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 2 settimane a temperatura ambiente in condizioni ottimali.

5. Procedura

5.1 Prova presuntiva

Prima di procedere all'inoculo di aliquote scalari del campione nei tubi del brodo per la prova presuntiva (4.1.1 o 4.1.2), agitare vigorosamente il campione per assicurare una distribuzione omogenea dei microrganismi sospesi nell'acqua. Dopo l'inoculo agitare leggermente i tubi e procedere all'incubazione in termostato entro 30 minuti. Incubare a 36±1°C. Dopo 24±2 ore agitare ciascun tubo per verificare la formazione di gas nella campanella ed eventualmente reincubare per altre 24 ore. Alla fine del periodo di incubazione registrare i risultati in base alla disposizione dei tubi che presentano produzione di gas ed intorbidimento del brodo. La produzione di gas entro le 48±3 ore costituisce una reazione positiva presuntiva, sottoporre alla prova di conferma i tubi risultati positivi.

5.2 Prova di conferma

Prelevare, sterilmente, 0,1 mL di brodocoltura dai tubi positivi del brodo per la prova presuntiva (formazione di gas entro le 48 ore) ed inoculare nei corrispondenti tubi contenenti il brodo per la prova di conferma (4.2.1). Incubare i tubi a 44±1°C per 24±2ore. Alla fine del periodo di incubazione, la formazione di gas nelle campanelle costituisce una reazione positiva per i coliformi fecali.
Annotare i risultati ottenuti indicando il numero di tubi positivi e negativi e, sulla base delle combinazioni ottenute, consultando la Tab. 1 (vedi Sezione 6020), calcolare, considerando l'eventuale diluizione, il valore dell'indice MPN.

6. Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come valore MPN/100 mL di campione.

7. Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero più probabile di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

8. METODO B. Metodo della filtrazione su membrana (MF)

Con questo metodo viene calcolata la concentrazione dei coliformi fecali che, presenti in un campione di acqua, sulla superficie di una membrana, posta su terreno di coltura agarizzato, hanno formato colonie tipiche prodotte dai microrganismi ricercati. Di seguito sono proposti due substrati d'isolamento alternativi.

8.1 Volume da analizzare

Per l'analisi è necessario determinare il volume in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare. Per acque reflue o comunque di bassa qualità generalmente è necessario analizzare diluizioni scalari del campione; mentre per acque già sottoposte a trattamento possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

9. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

10. Reattivi e terreni di coltura

10.1 Terreni di isolamento

10.1.1 m-FC Agar

Composizione:

Triptosio	10	g
Proteose peptone n. 3 o polipeptone	5	g
Estratto di lievito	3	g
Sodio cloruro	5	g
Lattosio	12,5	g
Sali di bile	1,5	g
Blu di anilina	0,1	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,4±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare in acqua distillata contenente 10 mL di acido rosolico all'1% in NaOH 0,2 N. Non sterilizzare. Conservare il terreno distribuito in capsule Petri a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

10.1.2 C-EC Agar

Composizione:

Triptosio	10	g
Triptofano	1	g
Peptocomplesso	5	g
Estratto di lievito	3	g
Sodio cloruro	5	g
Sali di bile n. 3	1,5	g
IPTG	0,1	g
5-Br-4Cl-3-indolil-D-galattopiranoside	0,08	g
4-metilumbelliferil-ß-D-glucuronide	0,05	g
Agar Bios LL	13	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 6,8±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere sterilizzare a 115±1°C per 15±1 minuti. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

10.2 Substrato di crescita

10.2.1 Agar soia triptone

Composizione:

Triptone	15	g
Peptone di soia	5	g
Sodio cloruro	5	g
Agar	20	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,2±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere, sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

10.3 Reattivo alla Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato

10.3.1 Soluzione di Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato all'1%

Composizione:

N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato	1	g
Acqua distillata	100	mL

Dischetti o tamponi adatti all'uopo sono anche disponibili in commercio; in alternativa sciogliere N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato in acqua distillata, preparando la soluzione al momento dell'uso.

Nota: *è da segnalare che tale prodotto viene classificato come sostanza pericolosa per la salute ai sensi della direttiva 67/548/CEE e successivi adeguamenti.*

11. Procedura

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa con porosità di 0,45 μm di diametro. Porre la membrana sulla superficie del substrato di isolamento e procedere all'incubazione a 44±1°C per 18-24 ore.

11.1 Lettura dei risultati

Sul terreno m-FC (10.1.1) i coliformi fecali crescono come colonie blu, ma possono presentare diverse sfumature del colore. Alcuni *Escherichia coli* possono formare colonie atipiche di colore giallo chiaro. Colonie di colore grigio-crema sono formate generalmente da coliformi non fecali.
Sul C-EC Agar (10.1.2) gli stessi microrganismi sviluppano colonie di colore verde-blu.
È possibile procedere, per la verifica dell'appartenenza alla famiglia delle Enterobatteriacee, a cui il gruppo dei coliformi fecali appartiene, alla prova della citocromossidasi (12.1), quale prova di conferma. Eventualmente effettuare l'identificazione delle colonie sospette utilizzando i sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica seguendo le indicazioni della ditta produttrice.

12. Conferma biochimica

12.1 Prova della citocromossidasi

Prima di effettuare la prova è necessario selezionare, isolando per striscio, le colonie sospette su Agar soia triptone (10.2.1) ed incubare a 36±1°C per 24±2 ore.
La prova permette di differenziare i microrganismi appartenenti al gruppo dei coliformi in base alla presenza dell'enzima citocromossidasi. I coliformi sono ossidasi-negativi.

13. Procedura

Prelevare, con le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile la colonia cresciuta sul terreno di crescita e strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo (10.3.1) preparato al momento dell'uso o saggiare sui dischetti o con i tamponi adatti all'uopo distribuiti in commercio. Una reazione negativa (tipica dei coliformi fecali) si manifesta con il mancato sviluppo di colore, mentre i microrganismi ossidasi-positivi producono una reazione che fornisce una colorazione blu-violetto entro pochi secondi.

14. Espressione dei risultati

Il numero di coliformi fecali isolati si calcola in base al numero di colonie contate, ed eventualmente sottoposte alla prova di conferma, considerando l'eventuale diluizione e riportando il valore come Unità Formanti Colonia per 100 mL di campione (UFC/100 mL).
Dal numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana e tenendo conto dei risultati delle prove di conferma, calcolare il numero di microrganismi presenti in 100 mL del campione in base alla seguente formula (1):

$$C = \frac{A \cdot N \cdot V_s \cdot F}{B \cdot V_t} \qquad (1)$$

dove:
C = numero di colonie che sono state confermate per 100 mL;
A = numero di colonie confermate;
B = numero di colonie da sottoporre a conferma;

N = numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana;
V_t = volume (mL) di campione analizzato;
V_s = volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 mL);
F = fattore di diluizione.

15. Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for examination of water and wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA).

GELDREICH E.E., CLARK H.F., HUFF C.B. & BEST L.C. (1965): "Fecal coliform organism medium for the membrane filter technique", *J. Am. Water Works Ass.*, **57**, 208.

7030. *Escherichia coli*

1. Introduzione

1.1 Generalità

Mentre le denominazioni "coliformi totali" e "coliformi fecali" fanno riferimento a gruppi eterogenei di batteri, il termine *Escherichia coli* corrisponde ad una specie tassonomicamente definita, a sua volta compresa nella famiglia delle Enterobatteriacee. *Escherichia coli* è un microrganismo a forma di bastoncello gram-negativo, aerobio ed anaerobio facoltativo, non sporigeno, che cresce alla temperatura di 44±1°C, lattosio-fermentante, indolo-positivo in terreni contenenti triptofano, β-D-glucuronidasi-positivo. In letteratura, la presenza di questo enzima è stata evidenziata nel 94-99,5 dei biotipi di *Escherichia coli*, con l'eccezione dei sierotipi O157:H7, e anche, in bassa percentuale, in *Shigella*, *Salmonella* e *Yersinia*. L'enzima non è prodotto dai coliformi; conseguentemente il rilevamento della sua presenza può essere usato per discriminare *Escherichia coli* da questi ultimi.
Per talune peculiari caratteristiche *Escherichia coli* sembra meglio soddisfare i requisiti insiti nella definizione di organismo indicatore, rispetto ai tradizionali indicatori di contaminazione fecale delle acque e già da tempo l'Organizzazione Mondiale della Sanità considera questa specie come indicatore primario di inquinamento di origine fecale. Tale scelta è motivata dalla maggiore stabilità della sua presenza nell'ambiente acquatico nel corso dell'anno rispetto ai coliformi, che risulterebbero più sensibili alle variazioni stagionali e, non di meno, dalla minore sensibilità del microrganismo alle procedure di disinfezione rispetto alla maggior parte dei patogeni enterici. Inoltre nell'ambito del gruppo dei coliformi, *Escherichia coli* è ampiamente rappresentato ed è in esclusivo rapporto con il tratto gastrointestinale dell'uomo e degli animali a sangue caldo.
Con i metodi tradizionali, che ne consentono una diagnosi solamente presuntiva, la determinazione analitica di *Escherichia coli* ha necessariamente sempre comportato lo svolgimento di una serie di prove di conferma. Più di recente sono stati formulati substrati diversi da quelli tradizionali, modificati con l'aggiunta di composti cromogeni e fluorogeni che si basano sullo sfruttamento di attività enzimatiche specifiche. I dati, riportati in letteratura anche da altri autori e ricavati da esperienze di laboratorio svolte anche nell'ambito di circuiti interlaboratoriali europei, confermano la possibilità di evidenziare, con questi substrati, in modo selettivo, direttamente la specie ricercata, con rese equivalenti o superiori rispetto ai terreni convenzionali.

1.2 Obiettivo

I metodi descritti consentono di valutare, in un determinato volume di acqua, la concentrazione di *Escherichia coli* mediante il calcolo statistico del Most Probable Number (MPN, numero più probabile) o con procedure di conta diretta.

1.3 Principio dei metodi

Di seguito sono proposti diversi metodi per il rilevamento di *Escherichia coli* (*Metodi A-F*), tutti basati, non più sulla tradizionale reazione della fermentazione del lattosio, bensì sul rilevamento dell'attività enzimatica della ß-glucuronidasi, evidenziabile dall'idrolisi di ß-glucuronidi cromogeni o fluorogeni, con rilascio di composti colorati o fluorescenti.

1.4 - Campo di applicazione

Le procedure analitiche di seguito riportate possono essere utilizzate per l'analisi di acque superficiali, di fiume, di lago e per acque reflue anche sottoposte a trattamento.

2. METODO A

Il metodo di seguito descritto corrisponde alla Norma ISO 9308-3: 1998. È applicabile all'analisi di tutti i tipi di acque superficiali e reflue, ed è particolarmente adatto all'esame di quelle ricche di materiale in sospensione. È di facile e rapido impiego.

2.1 Principio del Metodo A

Il campione diluito è inoculato in 96 pozzetti da 350 μL contenenti il terreno di coltura disidratato. Dopo un periodo di incubazione di 36-72 ore a 44±1°C si procede alla lettura dei risultati sotto lampada a ultravioletti (366 nm). *Escherichia coli*, idrolizzando il 4-metilumbelliferil-β-D-glucuronide (MUG), produce fluorescenza blu nei pozzetti. I risultati sono espressi come numero più probabile o Most Probable Number (MPN) per 100 mL di campione.

2.2 Volume da analizzare

Per l'analisi è necessario determinare le diluizioni da inoculare in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare.
In Tab. 1, per l'analisi di diverse tipologie di acque, vengono riportati il numero di diluizioni in funzione del livello di contaminazione presunto.

2.3 Strumentazione e vetreria

Per lo svolgimento dell'analisi, dalla preparazione del terreno colturale alla lettura dei risultati, oltre alla normale attrezzatura di laboratorio sono necessari:

- essiccatore;
- lampada di Wood per l'osservazione a 366 nm;
- micropipetta a 8 canali per l'inoculo di 200 μL;
- nastro adesivo sterile;
- piastre Petri;
- piastre sterili a 96 pozzetti da 350 μL, non fluorescenti e a fondo piatto;
- puntali sterili per micropipetta;
- tubi per diluizioni.

Tabella 1: Esempi di diluizione in funzione del livello di contaminazione delle acque

Tipo di acqua	N° di diluizioni	N° di pozzetti/diluizione		Valori limite di misura N° batteri/100 mL
Superficiale marina	2	64	a 1:2	$15\text{-}3{,}5 \cdot 10^4$
		32	a 1:20	
		24	a 1:2	
		24	a 1:20	
Superficiale dolce	4	24	a 1:200	$40\text{-}3{,}2 \cdot 10^6$
		24	a 1:2000	
Reflua grezza e trattata	6	16 oltre 16	a 1:2 a 1:200000	$60\text{-}6{,}7 \cdot 10^8$

2.4 Reattivi e terreni di coltura

2.4.1 MUG/EC Medium

Composizione:

Triptone	40	g
Salicina	1	g
Triton X 100	1	g
MUG	100	mg
Acqua distillata	1000	mL

Il terreno si trova in commercio disidratato e pronto per l'uso, già distribuito in piastre a 96 pozzetti corredate di nastro adesivo. Per la procedura di analisi, seguire le istruzioni della ditta produttrice.
Qualora si proceda alla sua preparazione, a 1 L di acqua distillata aggiungere triptone, salicina e Triton (il Triton X 100 è uno dei prodotti utilizzabili, disponibili in commercio; possono comunque essere utilizzati prodotti equivalenti purché sia dimostrato forniscano gli stessi risultati), mantenendo in agitazione fino ad ebollizione e completa dissoluzione degli ingredienti. Raffreddare ed aggiungere il MUG disciolto in 2 mL di N,N-dimetilformamide. Aggiustare il pH a 6,9±0,2.
Sterilizzare per filtrazione attraverso membrane con porosità nominale di 0,2 μm. Distribuire in aliquote da 100 μL in ciascuno dei 96 pozzetti in piastra. Disidratare immediatamente in un essiccatore o sotto cappa a flusso laminare.

Nota: *la N,N-dimetilformamide è tossica. Il prodotto può causare il cancro ed è nocivo per inalazione, contatto con la pelle e per ingestione. Il suo utilizzo richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione: protezione respiratoria (mascherina antipolvere e uso di cappa aspirante), protezione delle mani (guanti protettivi), protezione della pelle (indumenti protettivi).*

2.4.2 Soluzione diluente

Composizione:

Acqua di mare sintetica	22,5	g
Soluzione di blu di bromofenolo	10	mL
Acqua distillata	1000	mL

Miscelare gli ingredienti e sterilizzare in autoclave a 121±3°C per 15-20 minuti.
Preparare la soluzione di blu di bromofenolo aggiungendo 0,04 g a 100 mL di etanolo al 50%. L'aggiunta di questa soluzione è facoltativa e utile solo per la colorazione della soluzione diluente.
In alternativa alla soluzione diluente sopra indicata, possono essere utilizzati altri diluenti, quali acqua distillata, a meno che le stesse diluizioni preparate per il conteggio di *Escherichia coli* non debbano essere usate per il conteggio degli enterococchi intestinali.

2.4.3 Acqua distillata

Utilizzare acqua distillata priva di sostanze inibenti la crescita nelle condizioni di prova. Sterilizzare l'acqua distillata a 121±3°C per 15-20 minuti.

2.5 Procedura

2.5.1 Preparazione delle diluizioni

2.5.1.1 Acque con salinità <30‰

Aggiungere 9 mL di soluzione diluente (2.4.2) in tutti i tubi preparati in base al numero delle diluizioni prescelte. Agitare il campione per ottenere una distribuzione omogenea dei microrganismi e, usando una pipetta sterile, trasferire 9 mL del campione nel primo tubo contenente 9 mL di soluzione diluente (diluizione 1:2). Usando una nuova pipetta, dopo miscelazione, trasferire 1 mL della prima diluizione al secondo tubo (diluizione 1:20) e procedere allo stesso modo per le diluizioni successive.

2.5.1.2 Acque con salinità ≥30‰

Aggiungere 9 mL di acqua distillata sterile (2.4.3) nel tubo della prima diluizione e 9 mL di soluzione diluente (2.4.2) a tutti i tubi successivi preparati in base al numero delle diluizioni prescelte. Agitare il campione per ottenere una distribuzione omogenea dei microrganismi e, usando una pipetta sterile, trasferire 9 mL del campione nel primo tubo contenente 9 mL di acqua distillata (diluizione 1:2). Usando una nuova pipetta, dopo miscelazione, trasferire 1 mL della prima diluizione al secondo tubo (diluizione 1:20) e procedere allo stesso modo per le diluizioni successive.

2.5.2 Semina delle diluizioni e incubazione

Con le adeguate regole di asepsi, versare la diluizione iniziale in una piastra Petri vuota sterile e, usando una micropipetta a 8 canali, distribuire 200 µL in ciascun pozzetto contenente il terreno disidratato (2.4.1), corrispondente alla prima diluizione. Operare in modo analogo per le diluizioni successive, cambiando la piastra Petri e i puntali ad ogni diversa diluizione. Coprire la piastra di inoculo con nastro adesivo sterile per prevenire contaminazioni esterne e disidratazione dell'inoculo.
Incubare le piastre inoculate a 44±1°C per almeno 36 ore e fino ad un massimo di 72 ore.

2.5.3 Lettura dei risultati

I pozzetti che sotto luce ultravioletta risultano blu-fluorescenti sono considerati positivi.

2.6 Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come valore MPN/100 mL di campione.
Se nessuno dei pozzetti è positivo, esprimere il risultato come <*n*/100 mL, dove *n* è il valore dell'indice MPN per 1 pozzetto positivo nelle condizioni di diluizioni impiegate.
Per il calcolo dell'indice MPN procedere determinando il numero caratteristico in base al numero di pozzetti positivi per ciascuna diluizione selezionata, che, con più di 3 diluizioni, dovrà corrispondere ad un numero composto da 3 cifre. Individuato il numero caratteristico, per calcolare il valore dell'MPN consultare la norma NF T 90-433: agosto 1997, ovvero consultare le tabelle fornite con il terreno colturale.

2.7 Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero più probabile di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

3. METODO B

Il metodo di seguito descritto viene riportato nel Manuale "Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater" sotto il nome di Enzyme Substrate Test. L'EPA ha approvato questo tipo di analisi, e le successive modifiche (possibilità di quantificare la concentrazione di

Escherichia coli tramite la tecnica dell'MPN), sotto il nome di MMO-MUG test (Colilert). L'AOAC ha inserito il metodo analitico in "Official Methods of Analysis" con il nome di "Defined Substrate Technology" (Colilert).
Recentemente la performance del metodo è stata valutata, anche in Italia, durante lo svolgimento di un circuito interlaboratoriale di confronto tra metodi con la collaborazione di diversi laboratori europei.
È applicabile all'analisi di acque poco e mediamente contaminate, anche oligotrofe, clorate e comunque contenenti *Escherichia coli* danneggiati. È di facile e rapido impiego.

3.1 Principio del metodo B

Il prodotto è già disponibile in commercio sotto forma di kit completo per l'inoculo del campione, utilizzabile in tubi e piastre multi-pozzetto, monouso, per lo svolgimento della tecnica del numero più probabile (MPN). Dopo un periodo di incubazione di 18 o 24 ore a 36±1°C si procede alla lettura dei risultati sotto lampada a ultravioletti (366 nm). *Escherichia coli*, idrolizzando il 4-metilumbelliferil-β-D-glucuronide (MUG), produce fluorescenza nei pozzetti. I risultati sono espressi come numero più probabile o Most Probable Number (MPN) per 100 mL di campione.

3.2 Volume da analizzare

Il volume da analizzare per qualsiasi tipologia di acque è 100 mL, sia che si tratti del campione tal quale, sia di una sua diluizione, quest'ultima da determinare comunque in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare.

3.3 Strumentazione e vetreria

Per lo svolgimento dell'analisi oltre alla normale attrezzatura di laboratorio sono necessari:
- lampada di Wood per l'osservazione a 366 nm;
- sigillatore automatico.

3.4 Reattivi e terreni di coltura

3.4.1 Defined Substrate Technology (Colilert)

Composizione:

Ammonio solfato	5	g
Manganese solfato	0,5	mg
Zinco solfato	0,5	mg
Magnesio solfato	100	mg
Sodio cloruro	10	g
Calcio cloruro	50	g
Sodio solfito	40	g
Amfotericina B	1	mg
O-nitrofenil-ß-D-galattopiranoside	0,5	g
4-metilumbellifenil-ß-D-glucuronide	75	mg
Solanium	0,5	g
Hepes buffer		
Sali di sodio	5,3	g
Acido organico	6,9	g

Il terreno disidratato viene distribuito in commercio in fiale già predosate per l'esame di 100 mL di campione o di una sua diluizione. Il kit fornisce la possibilità di leggere i risultati dopo 18 o 24 ore.

3.5 Procedura

Seguendo le istruzioni della ditta produttrice, mescolare, in un flacone sterile, il terreno disidratato (3.4.1) con 100 mL di campione o di una sua diluizione. Chiudere il flacone e mescolare per sciogliere completamente il terreno. Attendere che l'eventuale formazione di schiuma sia sparita e versare il contenuto del flacone nella piastra sterile a 51 pozzetti o in quella a 97 pozzetti. Sigillare la piastra inoculata con l'apposito sigillatore automatico (3.3) che provvede anche alla distribuzione del campione all'interno dei pozzetti.

3.5.1 Incubazione

Incubare a 36±1°C entrambi i tipi di piastre per un periodo di 18 ore per Colilert 18 e di 24 ore per Colilert.

3.5.2 Lettura e interpretazione dei risultati

I pozzetti che sotto luce ultravioletta risultano fluorescenti sono considerati positivi per *Escherichia coli.* Senza diluizioni la piastra a 51 pozzetti permette la lettura da 1 a 200 microrganismi/100 mL; la piastra a 97 pozzetti permette la lettura da 1 a 2419 microrganismi/100 mL.

3.6 Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come valore MPN/100 mL di campione.
I valori dell'indice MPN sono calcolati in base alla tabella specifica fornita con il kit di analisi.

3.7 Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero più probabile di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

4. METODO C

Questo metodo permette di contare il numero delle colonie di *Escherichia coli* cresciute su una membrana posta su terreno colturale agarizzato addizionato con sostanze cromogene.
In presenza di elevate concentrazioni di *Escherichia coli* nel campione, la lettura dei risultati può rivelarsi complicata dalla diffusione e confluenza della fluorescenza prodotta dalle colonie tipiche. Pertanto il metodo risulta più idoneo all'analisi di acque trattate e comunque poco contaminate.

4.1 Principio del metodo C

Un'aliquota del campione o una sua diluizione sono filtrati attraverso una membrana di esteri di cellulosa di 0,45 μm di porosità nominale. Dopo un periodo di incubazione di 18-24 ore a 44±1°C si procede alla lettura dei risultati sotto lampada a ultravioletti (366 nm). Il composto 4-metilumbelliferil-β-D-glucuronide (MUG), incorporato nel terreno, viene idrolizzato dalla β-glucuronidasi di *Escherichia coli,* rilasciando il composto 4-metilumbelliferone che produce quindi colonie di colore blu-verde, fluorescenti alla luce ultravioletta.
I risultati sono espressi come Unità Formanti Colonia (UFC) per 100 mL di campione.

4.2 Volume da analizzare

Per l'analisi è necessario determinare il volume in base alla tipologia e alla qualità dell'ac-

qua da esaminare. Per acque reflue o comunque di bassa qualità generalmente è necessario analizzare diluizioni scalari del campione; mentre per acque già sottoposte a trattamento possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

4.3 Strumentazione e vetreria

Oltre alla normale attrezzatura di laboratorio è necessaria la lampada di Wood per l'osservazione a 366 nm.

4.4 Reattivi e terreni di coltura

4.4.1 C-EC Agar

Composizione:

Triptosio	10	g
Triptofano	1	g
Peptocomplesso	5	g
Estratto di lievito	3	g
Sodio cloruro	5	g
Sali di bile n. 3	1,5	g
IPTG	0,1	g
5-Br-4Cl-3-indolil-D-galattopiranoside	0,08	g
4-metilumbelliferil-ß-D-glucuronide	0,05	g
Agar Bios LL	13	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 6,8±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere sterilizzare a 115±1°C per 15±1 minuti. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.
Il terreno è adatto per l'analisi di acque con basse concentrazioni di *Escherichia coli*.

4.5 Procedura

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa con porosità di 0,45 µm di diametro. Porre la membrana sulla superficie del substrato di isolamento (4.4.1) e procedere all'incubazione a 44±1°C per 18-24 ore.

4.5.1 Lettura e interpretazione dei risultati

Escherichia coli sviluppa colonie tipiche di colore verde-blu che risultano fluorescenti alla luce ultravioletta. Le colonie atipiche crescono di colore biancastro o incolori.

4.6 Espressione dei risultati

Il numero di *Escherichia coli* si calcola in base al numero di colonie contate, riportando il valore come Unità Formanti Colonia per 100 mL di campione (UFC/100 mL).

4.7 Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

5. METODO D

Questo metodo permette di contare il numero delle colonie di *Escherichia coli* cresciute su una membrana posta su terreno colturale agarizzato addizionato con sostanze cromogene.
Il metodo risulta idoneo all'analisi di acque reflue e superficiali.

5.1 Principio del metodo D

Un'aliquota del campione o una sua diluizione sono filtrati attraverso una membrana di esteri di cellulosa di 0,45 μm di porosità nominale. Dopo un periodo di incubazione di 18-24 ore a 44±1°C si procede alla lettura dei risultati. Il composto cromogeno 5-Br-4-Cl-3-indolil-β-D-glucuronide (X-Gluc), incorporato nel terreno, viene idrolizzato dalla β-glucuronidasi di *Escherichia coli* che produce quindi colonie di colore blu-verde.
I risultati sono espressi come Unità Formanti Colonia (UFC) per 100 mL di campione.

5.2 Volume da analizzare

Per l'analisi è necessario determinare il volume in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare. Per acque reflue o comunque di bassa qualità generalmente è necessario analizzare diluizioni scalari del campione; mentre per acque già sottoposte a trattamento possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

5.3 Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

5.4 Reattivi e terreni di coltura

5.4.1 Chromogenic E. coli Agar

Composizione:

Triptone	20	g
Triptofano	1	g
Estratto di lievito	5	g
Sodio cloruro	5	g
Sali di bile n. 3	1,5	g
Sodio fosfato bibasico	5	g
Potassio fosfato monobasico	1,5	g
X-Gluc	0,06	g
Agar	12	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,0±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

5.5 Procedura

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa con porosità di 0,45 μm di diametro. Porre la membrana sulla superficie del substrato di isolamento (5.4.1) e procedere all'incubazione a 44±1°C per 18-24 ore.

5.5.1 Lettura e interpretazione dei risultati

Escherichia coli sviluppa colonie tipiche di colore verde-blu. Le colonie atipiche crescono incolori.

5.6 Espressione dei risultati

Il numero di *Escherichia coli* si calcola in base al numero di colonie contate, riportando il valore come Unità Formanti Colonia per 100 mL di campione (UFC/100 mL).

5.7 Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

6. METODO E

Questo metodo permette di contare il numero delle colonie di *Escherichia coli* cresciute su una membrana posta su terreno colturale agarizzato addizionato con sostanze cromogene.
Il metodo risulta idoneo all'analisi di acque trattate e comunque contenenti *Escherichia coli* danneggiati.

6.1 Principio del metodo E

Un'aliquota del campione o una sua diluizione sono filtrati attraverso una membrana di esteri di cellulosa di 0,45 μm di porosità nominale. Dopo un periodo di incubazione di 18-24 ore a 36±1°C si procede alla lettura dei risultati. Il composto cromogeno 5-Br-4-Cl-3-indolil-β-D-glucuronide (X-Gluc), incorporato nel terreno, viene idrolizzato dalla β-glucuronidasi di *Escherichia coli* che produce quindi colonie di colore grigio-blu.
I risultati sono espressi come Unità Formanti Colonia (UFC) per 100 mL di campione.

6.2 Volume da analizzare

Per l'analisi è necessario determinare il volume in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare. Per acque reflue o comunque di bassa qualità generalmente è necessario analizzare diluizioni scalari del campione; mentre per acque già sottoposte a trattamento possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

6.3 Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

6.4 Reattivi e terreni di coltura

6.4.1 Chromogenic Coliform Agar

Composizione:

Triptosio	10	g
Triptofano	0,1	g
Estratto di lievito	3	g
Peptocomplex	5	g
Sodio cloruro	5	g
Sali di bile n. 3	1,5	g
IPTG	0,1	g
X-Gluc	0,06	g
Salmon Gal	0,15	g
Agar	13	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,0±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

6.5 Procedura

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa con porosità di 0,45 μm di diametro. Porre la membrana sulla superficie del substrato di isolamento (6.4.1) e procedere all'incubazione a 36±1°C per 18-24 ore.

6.5.1 Lettura e interpretazione dei risultati

Escherichia coli sviluppa colonie tipiche di colore grigio-blu. Le colonie di coliformi crescono di colore salmone e le colonie atipiche incolori.

6.6 Espressione dei risultati

Il numero di *Escherichia coli* si calcola in base al numero di colonie contate, riportando il valore come Unità Formanti Colonia per 100 mL di campione (UFC/100 mL).

6.7 Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

7. METODO F

Il metodo di seguito descritto è stato prodotto su indicazione del Public Health Laboratory Service (PHLS) e contiene il composto cromogeno 5-Br-4-Cl-3-indolil-β-D-glucuronide (BCIG).
La "performance" del metodo è stata valutata, anche in Italia, durante lo svolgimento di un circuito interlaboratoriale di confronto tra metodi con la collaborazione di diversi laboratori europei.
Il metodo permette di contare il numero delle colonie di *Escherichia coli* cresciute su una membrana posta su terreno colturale agarizzato addizionato con sostanze cromogene.
Il metodo risulta particolarmente idoneo all'analisi di acque superficiali dolci o marine e di acque reflue.

7.1 Principio del metodo F

Un'aliquota del campione o una sua diluizione è filtrata attraverso la membrana di esteri di cellulosa con pori di 0,45 μm. Dopo un periodo d'incubazione di 18-24 ore a 44±1°C si procede alla lettura dei risultati. Il composto cromogeno 5-Br-4-Cl-3-indolil-β-D-glucuronide (X-Gluc), incorporato nel terreno, viene idrolizzato dalla β-glucuronidasi di *Escherichia coli,* che produce quindi colonie di colore blu-verde.
I risultati sono espressi come Unità Formanti Colonia (UFC) per 100 mL di campione.

7.2 Volume da analizzare

Per l'analisi è necessario determinare il volume in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare. Per acque reflue o comunque di bassa qualità generalmente è necessario analizzare diluizioni scalari del campione; mentre per acque già sottoposte a trattamento possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

7.3 Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

7.4 Reattivi e terreni di coltura

7.4.1 Tryptone Bile X-Glucuronide Agar

Composizione:

Triptone	20	g
Sali di bile n. 3	1,5	g
X-Gluc	0,075	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,2±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

7.5 Procedura

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa con pori di 0,45 μm di diametro. Porre la membrana sulla superficie del substrato di isolamento (7.4.1) e procedere all'incubazione a 44±1°C per 18-24 ore.

7.5.1 Lettura e interpretazione dei risultati

Escherichia coli sviluppa colonie tipiche di colore verde-blu.

7.6 Espressione dei risultati

Il numero di *Escherichia coli* si calcola in base al numero di colonie contate, riportando il valore come Unità Formanti Colonia per 100 mL di campione (UFC/100 mL).

7.7 Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*", 9223 B Enzyme Substrate Test, XX Ed., (Washington, APHA).

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (1995): "*Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists; AOAC Official Method 991. 15. Total coliforms and Escherichia coli in water, Defined Substrate Technology (Colilert) Method*, 16th Edition, AOAC International, Arlington, Vi.

BONADONNA L. & VOLTERRA L. (1992): "Un metodo rapido per l'analisi microbiologica dell'acqua: il test Autoanalysis Colilert", *Biologi italiani*, **10**, 14-17.

BONADONNA L. & VILLA L. (1993): "Un substrato cromogeno per l'isolamento dei coliformi totali nelle acque: il C-EC-MF", *IRSA-Notiziario Metodi Analitici per le Acque*, **13**, 3-7.

BONADONNA L., CHIARETTI G., COCCIA A.M. & SEMPRONI M. (1997): "Valutazione comparativa di procedure analitiche per il rilevamento di Enterobacteriaceae in acque marine costiere", Rapporti ISTISAN 97/3, pp. 42.

BRIANCESCO R., COCCIA A.M., DELLA LIBERA S., SEMPRONI M. & BONADONNA L. (2000): "Nuovi orientamenti normativi per il controllo delle acque: la ricerca di *Escherichia coli*", *Igiene e Sanità Pubblica*, LVI, 85-94.

HERNANDEZ J.F., GUIBERT J.M., DELATTRE J.M., OGER C., CHARRIERE C., HUGHES B., SERCEAU R. & SINEGRE F. (1991): "Miniaturized fluorogenic assays for enumeration of *E. coli* and enterococci in marine water", *Wat. Sci. and Technol.*, **24**, 137-141.

ISO (1998): "*Water quality - Detection and enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria in surface and waste water. Part 3: Miniaturized method (Most Probable Number) by inoculation in liquid medium*", ISO Cont. 06/ 09308-03.

KILIAN M. & BULOW P. (1976): "Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae I. Detection of bacterial glycosidases", *Acta Pathol. Microbiol. Scandinavica* (section B), **84**, 245-251.

PHLS, Public Health Laboratory Service (1994): "*The microbiology of water. Methods for the examination of waters and associated materials*", Report No. 71, Her Majesty's Stationary Office, London.

US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1994): "*Federal Register - National Primary and Secondary Drinking Water Regulations: Analytical Methods for regulated drinking water contaminant*", Final Rule. Part V, 40 CFR Part 141-143. Federal Register **59**, 62456.

WALTER K.S., FRICKER E.J. & FRICKER C. R. (1994): "Observation on the use of a medium detecting β-glucuronidase activity and lactose fermentation for the simultaneous detection of *E coli* and coliforms", *Letters in Applied Microbiology*, **19**, 47-49.

WHO, World Health Organization (1993): "*Guidelines for drinking water quality*", 2nd Edition, Ginevra.

7040. Streptococchi fecali ed enterococchi

1 Introduzione

1.1 Generalità

Il gruppo degli Streptococchi fecali è stato considerato per lungo tempo efficace indicatore di contaminazione fecale per gli ecosistemi acquatici. Sebbene alcuni autori considerino i termini streptococchi fecali, enterococchi, enterococchi intestinali e gruppo *Enterococcus* sinonimi nel caso delle specie rilevabili nell'ambiente, l'ordinamento tassonomico del gruppo, negli ultimi anni, è stato oggetto di ampia revisione. Con il termine Streptococchi fecali è stato indicato un gruppo di microrganismi eterogeneo sia dal punto di vista tassonomico sia ecologico, raggruppati insieme sulla base della morfologia microscopica, della reattività alla colorazione di Gram e della assenza dell'enzima catalasi. Gli studi più recenti hanno distinto invece, sulla base di caratteristiche fisiologiche e di tecniche di ibridizzazione del DNA, tre generi diversi di cui due (*Enterococcus* e *Streptococcus*) comprenderebbero specie intestinali o di origine fecale. Attualmente il genere *Enterococcus* comprende 17 specie determinate sulla base delle sequenze della subunità 16S dell'rRNA che hanno permesso di individuare la presenza di specie di gruppo. Le specie appartenenti al genere *Enterococcus* soddisfano specifici requisiti: crescita a 10°C e 45°C, resistenza a 60°C per 30 minuti, crescita a pH 9,6 e a 6,5% di NaCl, idrolisi del 4-metilumbelliferil-β-D-glucoside (MUD) in presenza di tallio acetato, acido nalidixico e 2,3,5- trifeniltetrazolio cloruro (TTC). I gruppi individuati in questo genere comprendono *Ent. faecium*, *Ent. durans*, *Ent. hirae*, *Ent. mundtii* (primo gruppo); *Ent. avium*, *Ent. pseudoavium*, *Ent. raffinosus* e *Ent. malodoratus* (secondo gruppo); *Ent. casseliflavus* e *Ent. gallinarum* (terzo gruppo); *Ent. faecalis*, *Ent. cecorum*, *Ent. colombae* e *Ent. saccharolyticus,* che hanno tra loro una bassa similarità genotipica, sono stati inseriti in un quarto gruppo. L'appartenenza di specie diverse al genere *Enterococcus*, anche dal punto di vista molecolare, comporta difficoltà nell'individuare test fenotipici capaci di identificare il genere. Anche il test già comunemente utilizzato per una conferma dell'appartenenza al gruppo più ampio degli streptococchi, l'idrolisi dell'esculina, se ancora utile ad individuare anche le nuove specie del genere *Enterococcus*, fornisce comunque reazione positiva anche per *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Aerococcus* e *Leuconostoc*.
Era stata precedentemente valutata la possibilità che la proporzione tra numero di streptococchi fecali e di coliformi fecali potesse dare una indicazione sulla origine fecale dell'inquinamento. Con un rapporto ≥4 la contaminazione si considerava presumibilmente di derivazione umana, mentre era considerata diversa (animale) se il rapporto fosse stato ≤0,7. Tuttavia il valore di questa proporzione è stato messo in discussione a causa della diversa capacità di sopravvivenza da parte dei microrganismi considerati. Inoltre, la maggiore resistenza all'azione dei disinfettanti da parte dei microrganismi del gruppo, alterando la proporzione numerica tra le due categorie di indicatori (streptococchi e coliformi), può essere causa di erronee interpretazioni. Pertanto il calcolo del rapporto tra i due indicatori di inquinamento fecale non dovrebbe avere validità per caratterizzare l'origine della contaminazione.
Nelle acque reflue le concentrazioni degli streptococchi fecali in 100 mL sono comprese generalmente tra 10^4-10^6.

1.2 Obiettivo

Il metodo consente di valutare, in un volume noto di acqua, la concentrazione dei microrganismi appartenenti al gruppo degli streptococchi/enterococchi.

1.3 Principio del metodo

La procedura analitica si basa sul conteggio dei microrganismi presenti in un volume noto del campione di acqua.
Possono essere utilizzate le seguenti tecniche analitiche:

- *Metodo A:* metodo del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN). Con questo metodo, che consiste in una prova presuntiva e in una prova di conferma, è calcolata la densità degli streptococchi/enterococchi in campioni di acqua tramite una stima statistica determinata sulla base della combinazione di tubi positivi e negativi ottenuti inoculando aliquote diverse del campione in terreno colturale liquido. Il risultato può essere ricavato, in base alle diverse combinazioni, dall'apposita tabella già predisposta (Tab.1, Sezione 6020).
- *Metodo B*: metodo del numero più probabile (Most Probable Number, MPN) in micropiastre a 96 pozzetti, basato sul rilevamento dell'attività enzimatica della ß-glucosidasi, evidenziabile dall'idrolisi di un ß-glucoside, con rilascio di composti colorati e fluorescenti. Il campione diluito è inoculato in 96 pozzetti da 350 µL contenenti il terreno di coltura disidratato. Dopo un periodo di incubazione di 36-72 ore a 44±1°C si procede alla lettura dei risultati sotto lampada di Wood (366 nm). L'idrolisi del 4-metilumbelliferil-β-D-glucoside (MUD) produce fluorescenza blu nei pozzetti.
- *Metodo C*: metodo della filtrazione su membrana (MF). Questo metodo permette di contare il numero delle colonie cresciute su una membrana posta su terreno colturale agarizzato. Esistono in commercio diversi substrati usati per l'isolamento degli streptococchi/enterococchi che garantiscono buoni risultati in fase analitica, anche se non esiste un unico substrato in grado di far crescere tutte le specie presenti. È necessario in ogni caso tenere in considerazione che la scelta di un substrato o dell'altro può essere effettuata sulla base dell'esperienza dell'operatore a condizione che ciò non comporti alcun cambiamento delle caratteristiche di produttività.

1.4 Campo di applicazione

La procedura analitica è utilizzata per acque superficiali, di fiume, di lago e per acque reflue anche sottoposte a trattamento.

2. METODO A. Metodo del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN)

Con questo metodo è calcolata la densità degli streptococchi/enterococchi in campioni di acque tramite la formula probabilistica che definisce il numero più probabile di batteri necessario a produrre combinazioni di tubi positivi e negativi in repliche di diluizioni decimali.
Il metodo è particolarmente adatto per l'esame di acque che presentano un'elevata torbidità.

2.1 Volume da analizzare

Per l'analisi è necessario determinare il volume in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare. Per acque reflue o comunque di bassa qualità generalmente è necessario analizzare diluizioni scalari del campione, mentre per acque già sottoposte a trattamento possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

2.2 Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

2.3 Reattivi e terreni di coltura

2.3.1 Brodi per lo svolgimento della prova presuntiva

2.3.1.1 Brodo all'Azide Destrosio

Composizione:

Estratto di carne	4,5	g
Triptone	15	g
Glucosio	7,5	g
Sodio cloruro	7,5	g
Sodio azide	0,2	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,2±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Adottare idonee precauzioni durante la preparazione del terreno che è tossico per la presenza di azide sodica. Evitare il contatto e l'inalazione. Dopo avere sciolto la polvere e prima della sterilizzazione, distribuire il terreno in tubi. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 1 settimana a temperatura ambiente in condizioni ottimali.

2.3.2 Brodo per lo svolgimento della prova di conferma

2.3.2.1 Brodo al Violetto di etile con Azide e Destrosio

Composizione:

Peptone	20	g
Destrosio	5	g
Sodio cloruro	5	g
Dipotassio idrogeno fosfato	2,7	g
Potassio diidrogeno fosfato	2,7	g
Sodio azide	0,4	g
Violetto di etile	0,83	mg
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,0±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Adottare idonee precauzioni durante la preparazione del terreno che è tossico per la presenza di azide sodica. Evitare il contatto e l'inalazione. Dopo avere sciolto la polvere e prima della sterilizzazione, distribuire il terreno in tubi. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 1 settimana a temperatura ambiente in condizioni ottimali.

2.4 Procedura

2.4.1 Prova presuntiva

Prima di procedere all'inoculo di aliquote scalari del campione nei tubi del brodo per la prova presuntiva (2.3.1.1), agitare vigorosamente il campione per assicurare una distribuzione omogenea dei microrganismi sospesi nell'acqua. Dopo l'inoculo agitare leggermente i tubi e procedere all'incubazione in termostato entro 30 minuti. Incubare a 36±1°C per 48±3 ore. Dopo incubazione, agitare ciascun tubo per verificare la presenza di torbidità (risultato positivo). Registrare i risultati in base alla disposizione dei tubi che presentano intorbidimento del brodo e sottoporre i tubi positivi alla prova di conferma.

2.4.2 Prova di conferma

Prelevare, sterilmente, 1 mL di brodocoltura dai tubi positivi del brodo per la prova presuntiva (torbidità entro le 48 ore) ed inoculare nei corrispondenti tubi contenenti il Brodo al Violetto di etile con Azide e Destrosio (2.3.2.1) per la prova di conferma. Incubare i tubi a 36±1°C per 24+24 (±3) ore. Considerare positivi i tubi che presentano intorbidimento accompagnato da un deposito grigio-violetto sul fondo del tubo.
Annotare i risultati ottenuti indicando il numero di tubi positivi e negativi e, sulla base delle combinazioni ottenute, consultando la Tab. 1 (vedi Sezione 6020), calcolare il valore dell'indice MPN.

2.5 Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come valore MPN/100 mL di campione.

2.6 Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero più probabile di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

3. METODO B. Metodo del numero più probabile (MPN) in micropiastre a 96 pozzetti

Il metodo di seguito descritto corrisponde alla Norma ISO 7899-1: 1998. È applicabile all'analisi di tutti i tipi di acque superficiali e reflue, ed è particolarmente adatto all'esame di quelle ricche di materiale in sospensione. È di facile e rapido impiego.

3.1 Volume da analizzare

Per l'analisi è necessario determinare le diluizioni da inoculare in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare.
Di seguito, per l'analisi di alcuni tipi di acqua vengono riportati alcuni esempi in funzione del presunto livello di contaminazione delle acque:

Tabella 1: Esempi di diluizione in funzione del livello di contaminazione delle acque

Tipo di acqua	N° di diluizioni	N° di pozzetti/diluizione		Valori limite di misura N° batteri/100 mL
Superficiale marina	2	64	a 1:2	$15\text{-}3{,}5\cdot10^{4}$
		32	a 1:20	
Superficiale dolce	4	24	a 1:2	
		24	a 1:20	$40\text{-}3{,}2\cdot10^{6}$
		24	a 1:200	
		24	a 1:2000	
Reflua grezza e trattata	6	16 oltre 16	a 1:2 a 1:200000	$60\text{-}6{,}7\cdot10^{8}$

3.2 Strumentazione e vetreria

Per lo svolgimento dell'analisi, dalla preparazione del terreno colturale alla lettura dei risultati, oltre alla normale attrezzatura di laboratorio sono necessari:

- essiccatore;
- lampada di Wood per l'osservazione a 366 nm;
- micropipetta a 8 canali per l'inoculo di 200 µL;

- nastro adesivo sterile;
- piastre Petri
- piastre sterili a 96 pozzetti da 350 µL, non fluorescenti e a fondo piatto;
- puntali sterili per micropipetta;
- tubi per diluizioni.

3.3 Reattivi e terreni di coltura

3.3.1 Soluzione diluente

Composizione:

Acqua di mare sintetica	22,5	g
Soluzione di blu di bromofenolo	10	mL
Acqua distillata	1000	mL

Miscelare gli ingredienti e sterilizzare in autoclave a 121±3°C per 15-20 minuti.
Preparare la soluzione di blu di bromofenolo aggiungendo 0,04 g a 100 mL di etanolo al 50%. L'aggiunta di questa soluzione è facoltativa e utile solo per la colorazione della soluzione diluente.

3.3.2 Acqua distillata

Utilizzare acqua distillata priva di sostanze inibenti la crescita nelle condizioni di prova. Sterilizzare l'acqua distillata a 121±3°C per 15-20 minuti.

3.3.3 Soluzione A: MUD/SF Medium

Composizione:

Triptosio	40	g
Potassio fosfato biidrato	10	g
D(+)-galattosio	2	g
Poliossietilenesorbitano monooleato (Tween 80)	1,5	mL
Acqua distillata	900	mL

Il terreno completo si trova in commercio disidratato e pronto per l'uso, già distribuito in piastre a 96 pozzetti corredate di nastro adesivo. Per la procedura di analisi, seguire le istruzioni della ditta produttrice.
Qualora si proceda alla sua preparazione, a 900 mL di acqua distillata aggiungere triptosio, potassio fosfato biidrato, galattosio e Tween 80 (il Tween 80 è uno dei prodotti utilizzabili, disponibili in commercio; possono comunque essere utilizzati prodotti equivalenti purché sia dimostrato che forniscano gli stessi risultati), mantenendo in agitazione fino ad ebollizione e completa dissoluzione degli ingredienti. Far raffreddare.

3.3.4 Soluzione B: all'acido nalidixico

Composizione:

Carbonato acido di sodio	4	g
Acido Nalidixico	250	mg
Acqua distillata	50	mL

Miscelare gli ingredienti a caldo mantenendo in agitazione. Fare raffreddare.

3.3.5 Soluzione C: al TTC

Composizione.

Tallio acetato	2	g
TTC	0,1	g
Acqua distillata	50	mL

Miscelare gli ingredienti a caldo mantenendo in agitazione. Fare raffreddare.

3.3.6 Soluzione D: al MUD

Composizione:

MUD	150	mg
N,N-dimetilformamide	2	mL

Miscelare gli ingredienti.

Nota: *la N,N-dimetilformamide è tossica. Il prodotto può causare il cancro ed è Nocivo per inalazione, contatto con la pelle e per ingestione. Il suo utilizzo richiede, da parte degli operatori, particolari precauzioni durante la manipolazione: protezione respiratoria (mascherina antipolvere e uso di cappa aspirante), protezione delle mani (guanti protettivi), protezione della pelle (indumenti protettivi).*

La procedura di preparazione del substrato completo prevede la miscelazione delle soluzioni A, B, C, D. Aggiustare il pH a 7,5±0,2.
Sterilizzare per filtrazione attraverso membrane con porosità nominale di 0,2 µm. Distribuire in aliquote da 100 µL in ciascuno dei 96 pozzetti in piastra. Disidratare immediatamente in un essiccatore o sotto cappa a flusso laminare.

3.4 Procedura

3.4.1 Preparazione delle diluizioni

3.4.1.1 Acque con salinità <30‰

Aggiungere 9 mL di soluzione diluente (3.3.1) in tutti i tubi preparati in base al numero delle diluizioni prescelte. Agitare il campione per ottenere una distribuzione omogenea dei microrganismi e, usando una pipetta sterile, trasferire 9 mL del campione nel primo tubo contenente 9 mL di soluzione diluente (diluizione 1:2). Usando una nuova pipetta, dopo miscelazione, trasferire 1 mL della prima diluizione al secondo tubo (diluizione 1:20) e procedere allo stesso modo per le diluizioni successive.

3.4.1.2 Acque con salinità ≥30‰

Aggiungere 9 mL di acqua distillata sterile (3.3.2) nel tubo della prima diluizione e 9 mL di soluzione diluente (3.3.1) a tutti i tubi successivi preparati in base al numero delle diluizioni prescelte. Agitare il campione per ottenere una distribuzione omogenea dei microrganismi e, usando una pipetta sterile, trasferire 9 mL del campione nel primo tubo contenente 9 mL di acqua distillata (diluizione 1:2). Usando una nuova pipetta, dopo miscelazione, trasferire 1 mL della prima diluizione al secondo tubo (diluizione 1:20) e procedere allo stesso modo per le diluizioni successive.

3.4.2 Semina delle diluizioni e incubazione

Con le adeguate regole di asepsi, versare la diluizione iniziale in una piastra Petri vuota sterile e, usando una micropipetta a 8 canali, distribuire 200 µL in ciascun pozzetto contenente il terreno disidratato, corrispondente alla prima diluizione. Operare in modo analogo per le diluizioni successive, cambiando la piastra Petri e i puntali ad ogni diversa diluizione. Coprire la piastra di inoculo con nastro adesivo sterile per prevenire contaminazioni esterne e disidratazione dell'inoculo.
Incubare le piastre inoculate a 44±1°C per almeno 36 ore e fino ad un massimo di 72 ore.

3.4.3 Lettura dei risultati

I pozzetti che sotto luce ultravioletta risultano blu-fluorescenti sono considerati positivi.

3.5 Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come valore MPN/100 mL di campione.
Se nessuno dei pozzetti è positivo, esprimere il risultato come <n/100 mL, dove n è il valore dell'indice MPN per 1 pozzetto positivo nelle condizioni di diluizioni impiegate.
Per il calcolo dell'indice MPN procedere determinando il numero caratteristico in base al numero di pozzetti positivi per ciascuna diluizione selezionata, che, con più di 3 diluizioni, dovrà corrispondere ad un numero composto da 3 cifre. Individuato il numero caratteristico, per calcolare il valore dell'MPN consultare la norma NF T 90-433: agosto 1997, ovvero consultare le tabelle fornite con il terreno colturale.

3.6 Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero più probabile di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

4. METODO C. Metodo della filtrazione su membrana (MF)

Con questo metodo viene calcolata la concentrazione di streptococchi/enterococchi che, presenti in un campione di acqua, sulla superficie di una membrana, posta su terreno di coltura agarizzato, hanno formato colonie tipiche prodotte dai microrganismi ricercati. Il metodo riportato corrisponde alla norma ISO 7899-2:2000.

4.1 Volume da analizzare

Per l'analisi è necessario determinare il volume in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare. Per acque reflue o comunque di bassa qualità generalmente è necessario analizzare diluizioni scalari del campione; mentre per acque già sottoposte a trattamento possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

4.2 Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

4.3 Reattivi e terreni di coltura

4.3.1 Terreni di isolamento

4.3.1.1 Terreno di Slanetz e Bartley

Composizione:

Triptosio	20	g
Estratto di lievito	5	g
Destrosio	2	g
Dipotassio idrogeno fosfato	4	g
Sodio azide	0,4	g
Agar	10	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,0±0,2		

4.3.1.2 Soluzione al 2,3,5–trifeniltetrazolio cloruro (TTC)

Composizione:

2,3,5 – trifeniltetrazolio cloruro	1	g
Acqua	100	mL

Sciogliere l'indicatore nell'acqua e sterilizzare per filtrazione (0,2 μm). Preparata la soluzione, proteggere dalla luce e scartare se assume una colorazione rosata.
Il terreno completo, contenente TTC, si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice.
Nel caso debba essere preparato dai singoli ingredienti, aggiungere, a 1000 mL di substrato 4.3.1.1, mantenuto a una temperatura di 50-60°C, 10 mL di soluzione di TTC (4.3.1.2). Qualora sia necessario correggere il pH, utilizzare una soluzione di sodio carbonato (100 g/L). Adottare idonee precauzioni durante la preparazione del terreno che è tossico e mutageno per la presenza di azide sodica. Evitare il contatto e l'inalazione. Non sterilizzare. Dopo la preparazione del terreno distribuire in capsule di Petri e conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

4.3.2 Substrati e reagenti di conferma

4.3.2.1 Terreno all'Esculina-bile-azide Agar

Composizione:

Triptone	17	g
Peptone	3	g
Estratto di lievito	5	g
Bile	10	g
Esculina	1,0	g
Ferro (III) ammonio citrato	0,5	g
Sodio cloruro	5	g
Sodio azide	0,15	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,1±0,1		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice.

Nota: *adottare idonee precauzioni durante la preparazione del terreno che è tossico e mutageno per la presenza di azide sodica. Evitare il contatto e l'inalazione.*

Dopo avere sciolto la polvere, sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

4.3.2.2 Agar Soia Triptone

Composizione:

Triptone	15	g
Peptone di soia	5	g
Sodio cloruro	5	g
Agar	20	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,2±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere, sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

4.3.2.3 Reattivo per la prova della catalasi

Perossido di idrogeno al 3%.
La soluzione è disponibile in commercio pronta all'uso alla concentrazione indicata.
Conservare al riparo dalla luce diretta e ad una temperatura di circa +4°C fino alla data di scadenza.

4.4 Procedura

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa con pori di 0,45 μm di diametro. Porre la membrana sulla superficie del substrato di isolamento e procedere all'incubazione a 36±1°C per 44±4 ore. Sono considerate come tipiche le colonie di colore dal rosa al rosso scuro e marrone (al centro o su tutta la colonia).
In presenza di colonie tipiche trasferire la membrana o singole colonie su piastre di esculina-bile-azide agar (4.3.2.1) preriscaldate a 44°C. Incubare a 44±1°C per 2 ore. Dopo incubazione si considerano positive le colonie in corrispondenza delle quali, sul retro della membrana, sul terreno all'esculina compare un alone nero-marrone.
Ad integrazione del metodo è possibile effettuare la prova della catalasi (4.3.2.2) che prevede la selezione, isolando per striscio, delle colonie sospette su Agar soia triptone (4.3.2.3) e l'incubazione a 36±1°C per 24÷48 (±2) ore. Strisciare su un vetrino portaoggetti la colonia da saggiare e ricoprirla con alcune gocce di perossido di idrogeno al 3%. Evidenziare la reazione: l'assenza della formazione di bolle costituisce una prova positiva per la caratterizzazione dei microrganismi ricercati che mancano di catalasi. La presenza dell'enzima è invece rilevata dallo sviluppo di bollicine di gas.
Eventualmente effettuare l'identificazione delle colonie sospette utilizzando i sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica sulla base delle indicazioni della ditta produttrice.

4.5 Espressione dei risultati (revisione della scritta dell'equazione)

Il numero di microrganismi si calcola in base al numero di colonie contate e sottoposte eventualmente a conferma e riportando il valore come Unità Formanti Colonia per 100 mL di campione (UFC/100 mL)
Dal numero di colonie caratteristiche contate, calcolare il numero di microrganismi presenti in 100 mL del campione in base alla seguente formula (1):

$$C = \frac{A \cdot N \cdot V_s \cdot F}{B \cdot V_t} \qquad (1)$$

dove:
C = numero di colonie che sono state confermate per 100 mL;
A = numero di colonie confermate;
B = numero di colonie da sottoporre a conferma;
N = numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana;
V_t = volume (mL) di campione analizzato;
V_s = volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 mL);
F = fattore di diluizione.

4.6 Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard methods for the Examination of Water and Wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA).

DECRETO 12 agosto 1985. "Ricerca degli streptococchi fecali in acque di balneazione con la tecnica delle membrane filtranti: prova finale alternativa", Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana del 3 settembre 1985, n. 207.

HERNANDEZ J.F., GUIBERT J.M., DELATTRE J.M., OGER C., CHARRIERE C., HUGHES B., SERCEAU R. & SINEGRE F. (1991): "Miniaturized fluorogenic assays for enumeration of E. coli and enterococci in marine water, *Wat. Sci. and Technol.*, **24**, 137-141.

ISO 7899-1: 1998 (E) (1998): *Water quality - Detection and enumeration of intestinal enterococci in surface and waste water*", Part 3: Miniaturized method (Most Probable Number) by inoculation in liquid medium, ISO Cont. 06/ 07899-01.

APPENDICE

Metodi rapidi (MF)

1. Introduzione

1.1. Generalità

Vengono proposti due metodi, da utilizzare eventualmente in alternativa a quelli proposti sopra, che consentono l'isolamento ed l'identificazione di streptococchi/enterococchi in campioni di acqua, su terreni agarizzati, mediante la tecnica delle membrane filtranti, nell'arco delle 24 ore.
In particolare uno dei due metodi (metodo A) prevede l'utilizzo di Agar Bile Esculina Azide; la capacità di idrolizzare esculina in presenza di sali biliari consente di enumerare direttamente i microorganismi appartenenti al gruppo streptococchi/enterococchi senza effettuare passaggi successivi. (Questa procedura è stata applicata presso i laboratori di Arpa Emilia-Romagna Sez. prov.le di Modena, su diverse matrici idriche fornendo risultati comparabili a quelli ottenibili con i terreni tradizionali [1]).
Il secondo metodo (metodo B) proposto corrisponde al Metodo EPA n. 1600, Maggio 1997 e

propone l'utilizzo di un terreno di coltura agarizzato contenente, oltre all'esculina ed al 2,3,5-trifeniltetrazolio cloruro (TTC), anche l'indoxil β-D-glucoside, che consente di evidenziare l'attività β-glucosidasica positiva tipica degli enterococchi mediante la formazione di un alone blu intorno alle colonie.

2. Volume da analizzare

Per l'analisi è necessario determinare il volume in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare. Per acque reflue o comunque di bassa qualità generalmente è necessario analizzare diluizioni scalari del campione; mentre per acque già sottoposte a trattamento possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

3. METODO A

3.1 Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

3.2 Reattivi e terreni di coltura

3.2.1 Terreni di isolamento

3.2.1.1 Terreno Bile Esculina Azide

Composizione:

Triptone	17	g
Peptone	3	g
Estratto di lievito	5	g
Bile	10	g
Esculina	1,0	g
Ferro (III) ammonio citrato	0,5	g
Sodio cloruro	5	g
Sodio azide	0,25	g
Agar	13.5	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,1±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Nel caso sia necessario correggere il pH, utilizzare una soluzione di sodio carbonato (100 g/L). Adottare idonee precauzioni durante la preparazione del terreno che è tossico e mutageno per la presenza di azide sodica. Evitare il contatto e l'inalazione. Dopo avere sciolto la polvere, sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di 2 settimane in condizioni ottimali.

3.3 Procedura

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa con porosità di 0,45 μm di diametro. Porre la membrana sulla superficie del substrato di isolamento e procedere all'incubazione a 35±2°C per 22 ±2 ore.
Sono considerate come tipiche le colonie convesse, traslucide o biancastre, diametro 1-2 mm, alone bruno scuro o nero ben evidente sul retro della piastra.
Si consiglia di non protrarre l'incubazione oltre le 24 ore in quanto la confluenza degli aloni potrebbe rendere difficoltosa la lettura.

Viceversa, nel caso di risultati negativi potrebbe essere opportuno prolungare l'incubazione fino alle 24 ore successive.
Analogamente ad altri terreni specifici per gli streptococchi/enterococchi anche questo terreno può non inibire del tutto lo sviluppo di microorganismi "non target"; pertanto, a discrezione dell'analista, si consiglia l'effettuazione della prova della catalasi (4.3.2.3) ed eventualmente l'identificazione delle colonie sospette con sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica.

4. METODO B

4.1 Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

4.2 Reattivi e terreni di coltura

4.2.1 Terreni di isolamento

4.2.1.1 Terreno Esculina Azide Indoxil β-D glucoside

Composizione:

Estratto di lievito	30	g
Peptone	10	g
Esculina	1,0	g
Actidione (Cicloesimide)	0,05	g
Sodio cloruro	15	g
Sodio azide	0,15	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL
Indoxil β-D glucoside	0.75	g
Acido Nalidixico	0.24	g
Trifenil Tetrazolio Cloruro (TTC)	0.02	g
pH finale 7,1±0,2		

Il terreno base si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice prima dell'aggiunta dell'acqua alla polvere aggiungere 0,75 grammi/L di Indoxil β-D glucoside quindi riscaldare fino a completa dissoluzione della polvere. Adottare idonee precauzioni durante la preparazione del terreno che è tossico e mutageno per la presenza di azide sodica. Evitare il contatto e l'inalazione. Sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti. quindi portare la temperatura a 44-46°C in bagnomaria.
Aggiungere separatamente 0,24 g/L di Acido Nalidixico (precedentemente disciolto in 5 mL di acqua distillata con l'aggiunta di poche gocce di NaOH 0,1 N) e 0,02 g/L di TTC.
Mescolare e distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare, conservare in frigorifero.

4.3 Procedura

Filtrare un'aliquota del campione o un volume di una sua diluizione attraverso una membrana di esteri di cellulosa con porosità di 0,45 μm di diametro. Porre la membrana sulla superficie del substrato di isolamento e procedere all'incubazione a 41±0,5°C per 22±2 ore.
Sono considerate come tipiche le colonie che, indipendentemente dal colore, presentano un alone blu. L'utilizzo di mezzi di ingrandimento per la conta e di una piccola lampada UV possono aumentare la visibilità delle colonie.
Si consiglia di non protrarre l'incubazione oltre le 24 ore in quanto l'espansione degli aloni potrebbe rendere difficoltosa la lettura.
Viceversa, nel caso di risultati negativi potrebbe essere opportuno prolungare l'incubazione

per le 24 ore successive.
Eventualmente effettuare l'identificazione delle colonie sospette utilizzando i sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica sulla base delle indicazioni della ditta produttrice.

5. Espressione dei risultati

Il numero di microrganismi si calcola in base al numero di colonie tipiche contate ed eventualmente sottoposte a conferma, riportando il valore come Unità Formanti Colonia per 100 mL di campione (UFC/100 mL).
Dal numero di colonie caratteristiche contate, calcolare il numero di microrganismi presenti in 100 mL del campione in base alla seguente formula (1):

$$C = \frac{A \cdot N \cdot V_s \cdot F}{B \cdot V_t} \qquad (1)$$

dove:
C = numero di colonie che sono state confermate per 100 mL;
A = numero di colonie confermate;
B = numero di colonie da sottoporre a conferma;
N = numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana;
V_t = volume (mL) di campione analizzato;
V_s = volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 mL);
F = fattore di diluizione.

6. Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

BIBLIOGRAFIA

U.S.E.P.A. (1997): "*Method 1600 May 1997. Membrane Filter Test Method for Enterococci in Water*". *Water*".

SCIALOJA M.G., LEV D. & SBALCHIERO A. (2002): "Enterococchi fecali", *Notiziario dei Metodi Analitici IRSA*, settembre 2002.

7050. Conteggio delle colonie su agar a 36°C e 22°C

1. Introduzione

1.1 Generalità

Il conteggio delle colonie su agar è un parametro che permette di rilevare un gruppo eterogeneo di microrganismi, aerobi ed anaerobi facoltativi che hanno differenti capacità metaboliche e richieste nutrizionali. L'uso di temperature diverse permette di mettere in evidenza microrganismi mesofili (a 36°C) e psicrofili (22°C). Molti di essi possono appartenere alla microflora ambientale autoctona delle acque, presente indipendentemente da qualsiasi contaminazione. Tuttavia è stato anche messo in evidenza che alcuni dei microrganismi rilevati possono comprendere specie patogene e/o opportuniste patogene. Il parametro va considerato come integrazione degli altri parametri.

1.2 Obiettivo

Il metodo consente di valutare, in un volume noto di acqua, la concentrazione di microrganismi coltivabili che producono colonie dopo incubazione a due temperature diverse.

1.3 Principio del metodo

La procedura analitica permette di contare le colonie che i microrganismi hanno prodotto nella compagine del terreno agarizzato, analizzando piccole aliquote note di campione che, vengono miscelate con il substrato mantenuto fuso e lasciato successivamente solidificare in capsule Petri. Di seguito vengono proposti tre substrati alternativi.

1.4 Campo di applicazione

La procedura analitica viene utilizzata per acque superficiali, di fiume, di lago e per acque reflue anche sottoposte a trattamento.

2. Tecnica dell'agar-germi

2.1 Volume da analizzare

Per l'analisi è generalmente necessario analizzare diluizioni scalari del campione; per acque già sottoposte a trattamento, in relazione alla loro qualità, possono essere analizzate diluizioni minori. Il metodo generalmente non consente di analizzare volumi superiori a 2 mL.

3. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

4. Reattivi e terreni di coltura

4.1 Substrati di isolamento

4.1.1 Plate Count Agar

Composizione:

Triptone	5	g
Estratto di lievito	2,5	g
Glucosio	1	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere, il terreno in beuta o in tubo, sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 2 settimane a temperatura ambiente in condizioni ottimali.

4.1.2 R2A

Composizione:

Estratto di lievito	0,5	g
Polipeptone	0,5	g
Idrolisato acido di caseina	0,5	g
Glucosio	0,5	g
Amido solubile	0,5	g
Fosfato bipotassico	0,3	g
Solfato di magnesio	0,024	g
Sodio piruvato	0,3	g
Agar	15,0	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,2±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Dopo avere sciolto la polvere il terreno, in beuta o tubo, sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 2 settimane a temperatura ambiente in condizioni ottimali.
Il substrato, con basse concentrazioni di nutrienti, è particolarmente adatto per l'analisi di acque oligotrofiche.

4.1.3 Agar all'estratto di lievito

Composizione:

Estratto di lievito	3	g
Triptone	6	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,2±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, per non più di 2 settimane a temperatura ambiente in condizioni ottimali.
Il substrato è riportato nella norma ISO 6222:1999.

5. Procedura

La procedura analitica per la conta dei microrganismi a 36±2°C e a 22±2°C è la stessa per entrambi i parametri.
Seminare in capsule Petri vuote aliquote non superiori a 2 mL del campione o di una sua diluizione. Versare, rispettando le regole di asepsi, circa 15 mL di substrato di isolamento (4.1) nella capsula contenente l'inoculo. Non superare i 20 minuti di intervallo tra il momento dell'inoculo in capsula e l'aggiunta del terreno colturale che deve essere mantenuto liquefatto in bagnomaria ad una temperatura intorno a 45°C. Mescolare accuratamente ruotando in un verso e nell'altro la piastra per permettere una completa miscelazione tra il terreno ed il campione. Lasciare solidificare e porre ad incubare a 36±2°C per 44±4 ore e a 22±2°C per 68±4 ore. Dopo incubazione, contare tutte le colonie ottenute, eventualmente con idoneo sistema di ingrandimento, su fondo scuro e scartare le piastre con crescita confluente.

6. Espressione dei risultati

Riportare il numero ottenuto come Unità Formanti Colonia per millilitro (UFC/mL) del campione per ciascuna temperatura di incubazione considerando l'eventuale diluizione effettuata.

7. Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for examination of water and wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA).

7060. Spore di clostridi solfito riduttori

1. Introduzione

1.1 Generalità

I clostridi sono microrganismi anaerobi obbligati; bacilli gram-positivi; producono ATP esclusivamente tramite fosforilazione a livello del substrato (che può essere costituito da amminoacidi, cellulosa, zuccheri semplici). Riducono il solfito con produzione di solfuri e producono spore termoresistenti. Sono normalmente saprofiti e vivono negli strati superficiali del terreno o nell'intestino di alcuni animali, compreso l'uomo. Il loro numero nelle feci, rispetto ai coliformi e agli streptococchi, è inferiore, in rapporto rispettivamente di circa 1/100 e 1/10. Alcune specie producono potenti esotossine (*Clostridium tetani* e *Clostridium botulinum*) che causano sindromi particolarmente gravi. Per i controlli della qualità delle acque i microrganismi vengono ricercati nella loro forma sporale. La loro presenza può essere indice di inquinamento fecale anche pregresso. Per la loro capacità di produrre forme di resistenza (spore), sono in grado di sopravvivere più a lungo nell'ambiente e di resistere ai trattamenti di depurazione e di disinfezione delle acque.

1.2 Obiettivo

Il metodo consente di valutare, in un volume noto di acqua, la concentrazione delle spore di clostridi solfito-riduttori.

1.3 Principio del metodo

Il metodo consente di valutare la concentrazione delle spore dei microrganismi appartenenti al genere *Clostridium* presenti in un volume d'acqua preventivamente trattato al calore per distruggere le forme microbiche vegetative, favorendo contemporaneamente la germinazione delle forme sporali.
Possono essere utilizzate due tecniche analitiche:

- *Metodo A:* metodo del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN). Con questo metodo è calcolata la concentrazione delle spore in campioni di acqua tramite una stima statistica determinata sulla base della combinazione di tubi positivi e negativi ottenuti inoculando aliquote diverse del campione in terreno colturale. Il risultato può essere ricavato, in base alle diverse combinazioni, dall'apposita tabella già predisposta (Tabella 2).
- *Metodo B:* metodo della filtrazione su membrana (MF). Questo metodo permette di contare il numero delle colonie cresciute su una membrana posta su terreno colturale. Esistono in commercio diversi substrati usati per l'isolamento delle spore di clostridi che garantiscono buoni risultati in fase analitica, anche se non esiste un unico substrato in grado di far crescere tutte le specie presenti. È necessario in ogni caso tenere in considerazione che la scelta di un substrato o di un altro può essere effettuata sulla base dell'esperienza dell'operatore, a condizione che ciò non comporti alcun cambiamento delle caratteristiche di produttività.

1.4 Campo di applicazione

La procedura analitica viene utilizzata per acque superficiali, di fiume, di lago e per acque reflue anche sottoposte a trattamento.

2. METODO A. Metodo del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN)

Con questo metodo viene calcolata la concentrazione delle spore in campioni di acque tramite la formula probabilistica che definisce il numero più probabile necessario a produrre combinazioni di tubi positivi e negativi in repliche di diluizioni decimali.
Il metodo è particolarmente adatto per l'esame di acque che presentano un'elevata torbidità.

2.1 Volume da analizzare

Per l'analisi è necessario determinare il volume in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare. Per acque reflue o comunque di bassa qualità generalmente è necessario analizzare diluizioni scalari del campione, mentre per acque già sottoposte a trattamento possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

3. Strumentazione e vetreria

Oltre alla normale attrezzatura di base di laboratorio, per lo svolgimento dell'analisi, è necessario avere a disposizione:
- giara per anaerobiosi

4. Reattivi e terreni di coltura

4.1 METODO A. Metodo del numero più probabile o dei tubi multipli (MPN)

4.1.1 Agar al Triptone Solfito e Neomicina

Composizione:

Peptone o Triptone	15	g
Solfito di sodio	1	g
Solfato di neomicina	0,02	g
Solfato di polimixina	0,05	g
Estratto di lievito	10	g
Citrato ferrico	0,5	g
Agar	13,5	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,0±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata e riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Distribuire in tubi di terreno e autoclavare a 118±3°C per 20±1 minuti. Conservare a circa +4°C per non più di un mese in condizioni ottimali.

4.1.2 Olio di vaselina sterile

4.1.3 Agar nutritivo base al sangue di coniglio

Composizione:

Estratto di carne	3	g
Peptone	5	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 6,8±0,2		

Il terreno di base si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata e riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Distribuire in provettoni o beute, sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti.
Dopo sterilizzazione, preparare, con le normali procedure, alcune piastre di terreno senza aggiunta di sangue; in altre piastre, in condizioni di asepsi, trasferire 0,5 mL di sangue defibrinato di coniglio (4.1.4) e aggiungere circa 12-13 mL di agar nutritivo preventivamente sciolto e portato a 50-60°C in bagno termostatato, miscelare e lasciar solidificare a temperatura ambiente. Il terreno colturale al sangue ha tempi di conservazione molto brevi; si consiglia pertanto di prepararlo al momento dell'uso.

4.1.4 Sangue defibrinato di coniglio

Il sangue defibrinato di coniglio è reperibile in commercio e si può conservare per circa una settimana a circa +4°C in condizioni ottimali.

4.1.5 Agar Columbia con 5% di sangue di montone

Composizione:

Bio-polyptone	10	g
Idrolizzato di proteine animali e vegetali	10	g
Bio-miotone	3	g
Amido di mais	1	g
Cloruro di sodio	5	g
Sangue di montone	50	mL
Agar	13,5	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,3±0,2		

Esistono in commercio diversi substrati per la crescita dei microrganismi appartenenti al genere *Clostridium*. In alternativa all'Agar nutritivo al sangue di coniglio (4.1.3) qui viene anche riportata la composizione dell'Agar Columbia con 5% di sangue di montone. Il terreno si trova in commercio già pronto per l'uso e preparato in piastre Petri. Ha tempi di conservazione molto brevi; si consiglia pertanto di comprarne piccoli lotti.
È necessario comunque tenere in considerazione che la scelta di un substrato o di un altro può essere effettuata sulla base dell'esperienza dell'operatore, a condizione che ciò non comporti alcun cambiamento delle caratteristiche di selettività, produttività, ecc.

4.1.6 Perossido di idrogeno al 3%

La soluzione è disponibile in commercio pronta all'uso alla concentrazione indicata.
Conservare al riparo dalla luce diretta e ad una temperatura di circa +4°C fino alla data di scadenza.

5. Procedura

5.1 Pretrattamento del campione

Mantenere il campione per 15±1 minuti a 75±5°C in bagno termostatato per l'inattivazione delle forme vegetative. Raffreddare il campione sotto acqua fredda prima di sottoporlo ad analisi.

5.2 Isolamento

Inoculare aliquote del campione in concentrazioni scalari in tubi contenenti il terreno (4.1.1). Effettuare l'inoculo nei tubi con il terreno disciolto e mantenuto tale alla temperatura di circa 45°C, avendo cura di distribuire bene il campione nel terreno evitando la formazione di bolle d'aria. Lasciar raffreddare ed aggiungere in ogni tubo alcuni millilitri di olio di vaselina (4.1.2). Incubare a 46±1°C per 24±2 ore.

6. Conteggio ed identificazione delle colonie

Considerare positivi i tubi con crescita di colonie nello spessore dell'agar che provocano annerimento del terreno.

7. Conferma

Qualora si ritenga opportuno procedere all'esecuzione di prove di conferma per l'accertamento dell'appartenenza al genere *Clostridium,* è necessario eseguire sulle colonie rilevate la colorazione di Gram e la prova della catalasi (7.1). Per una identificazione, a livello di specie, dei microrganismi isolati si possono utilizzare i kit miniaturizzati di prove biochimiche disponibili in commercio.
Trasferire la colonia da saggiare, mediante semina per strisciamento in superficie in due piastre contenenti agar nutritivo con sangue di coniglio (4.1.3) o in alternativa in due piastre di agar Columbia con 5% di sangue di montone (4.1.5). Incubare una piastra a 36±1°C per 24 ore, l'altra alla stessa temperatura per 24 ore, ma in anaerobiosi.
I microrganismi appartenenti al genere *Clostridium* cresceranno unicamente sul terreno incubato in anaerobiosi. Procedere allo svolgimento della prova della catalasi.

7.1 Prova della catalasi

La prova della catalasi serve per differenziare i batteri solfito-riduttori appartenenti al genere *Clostridium* (catalasi negativi) da quelli appartenenti al genere *Bacillus* (catalasi positivi).
Seminare la colonie da saggiare su agar nutritivo (4.1.3) e incubare a 36±1°C per 24±2 ore in anaerobiosi. Strisciare su un vetrino da microscopio una colonia in esame quindi ricoprire con una goccia di perossido d'idrogeno (4.1.6).
La reazione negativa, tipica del genere *Clostridium,* è evidenziata dalla mancata formazione di bolle (liberazione di gas).

8. Espressione dei risultati

Sulla base delle positività ottenute consultare la Tab. 1 (vedi Sezione 6020) ed esprimere il risultato come MPN/100 mL.
Dal numero di colonie caratteristiche contate e tenendo conto dei risultati delle prove di conferma, calcolare il numero di spore di clostridi presenti in 100 mL del campione in base alla seguente formula (1):

$$C = \frac{A \cdot N \cdot V_s \cdot F}{B \cdot V_t} \qquad (1)$$

dove:
C = numero di colonie che sono state confermate per 100 mL;
A = numero di colonie confermate;
B = numero di colonie da sottoporre a conferma;
N = numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana;
V_t = volume (mL) di campione analizzato;
V_s = volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 mL);
F = fattore di diluizione.

9. Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero più probabile di spore di clostridi solfito riduttori per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

10. METODO B. Metodo della filtrazione su membrana (MF)

Con questo metodo viene calcolata la concentrazione delle spore di clostridi che, presenti in un campione di acqua, sulla superficie di una membrana, posta su terreno di coltura agarizzato, hanno formato colonie tipiche prodotte dai microrganismi ricercati. Di seguito vengono proposti due substrati di isolamento alternativi.

10.1 Volume da analizzare

Per l'analisi è necessario determinare il volume in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare. Per acque reflue o comunque di bassa qualità generalmente è necessario analizzare diluizioni scalari del campione; mentre per acque già sottoposte a trattamento possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

11. Strumentazione e vetreria

Oltre alla normale attrezzatura di base di laboratorio, per lo svolgimento dell'analisi, è necessario avere a disposizione:

- giara per anaerobiosi.

12. Reattivi e terreni di coltura

12.1 Terreni di isolamento

12.1.1 Agar al Solfito Polimixina Solfadiazina

Composizione:

Solfito di sodio	0,5	g
Solfato di polimixina	0,01	g
Sulfodiazina	0,12	g
Triptone o peptone	15	g
Estratto di lievito	10	g
Citrato di ferro	0,5	g
Sodio tioglicollato	0,1	g
Sorbitan monooleato	0,05	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,0±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata e riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Distribuire in provettoni o beute fino all'analisi. Sterilizzare a 118±3°C per 15±1 minuti. Conservare a circa +4°C per non più di un mese in condizioni ottimali.

12.1.2 Terreno di base: Triptosio Solfito Cicloserina Agar

Composizione:

Triptosio	15	g
Peptone di soia	5	g
Estratto di lievito	5	g
Metabisolfito di sodio	1	g
Citrato di ferro (III) e ammonio	1	g
Agar	14	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,6±0,1		

Il terreno così come formulato è riportato in ISO WD 6461-2:2001 e costituisce il terreno di base a cui deve essere aggiunta un'aliquota della soluzione di cicloserina (12.1.3) per la preparazione del substrato completo. Il metodo che utilizza questa formulazione consente di isolare in modo più specifico *Clostridium perfringens*.
Reidratare il terreno in acqua distillata e riscaldare agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Distribuire in provettoni o beute fino all'analisi. Sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti. Conservare a circa +4°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

12.1.3 Soluzione di Cicloserina

Composizione:

D-cicloserina	10	g
Acqua	100	mL

Sciogliere la cicloserina in acqua e sterilizzare per filtrazione attraverso membrane con pori di 0,45 µm di diametro. Distribuire in tubi e conservare a temperatura intorno a -20°C.
Per la preparazione del substrato completo, a 1000 mL di terreno di base (12.1.2) aggiun-

gere 4 mL di soluzione di cicloserina (12.1.3). Distribuire in piastre Petri e conservare a circa +4°C per non più di due giorni dalla preparazione.

12.1.4 Agar nutritivo al sangue di coniglio (4.1.3)

12.1.5 Sangue defibrinato di coniglio (4.1.4)

12.1.6 Agar Columbia con 5% di sangue di montone (4.1.5)

12.1.7 Perossido di idrogeno al 3% (4.1.6)

13. Procedura

13.1 Pretrattamento del campione (vedi Paragrafo 5.2)

13.2 Filtrazione e incubazione

Sciogliere il terreno di isolamento Agar al Solfito Polimixina Solfadiazina (12.1.1) e versarne un'aliquota in una piastra Petri, lasciar solidificare a temperatura ambiente. Mantenere il rimanente terreno allo stato liquido alla temperatura di 50-60°C.
Filtrare un'aliquota di campione pretrattato utilizzando una membrana di acetato di cellulosa con porosità nominale di 0,45 µm. Trasferire la membrana sul terreno facendola aderire perfettamente. Versare su di essa, con cautela, un'aliquota dello stesso terreno mantenuto allo stato liquido in modo da ricoprirla interamente e lasciare solidificare a temperatura ambiente.
Incubare a 36±1°C per 48±2 ore in condizioni anaerobie in giara o con apposito kit per anaerobiosi.
Se utilizzato il terreno di isolamento completo Triptosio Solfito Cicloserina Agar, filtrare un'aliquota di campione pretrattato utilizzando una membrana di acetato di cellulosa con porosità nominale di 0,45 µm. Trasferire la membrana sul substrato completo facendola aderire perfettamente. Incubare a 44±1°C per 21±3 ore in condizioni anaerobie in giara o con apposito kit per anaerobiosi.

13.3 Conteggio ed identificazione delle colonie

Su entrambi i terreni di isolamento (12.1) la presenza di anaerobi solfito-riduttori è evidenziata dalla comparsa di colonie nere con alone nerastro evidenziabile sopra o sotto la membrana.

14. Conferma

Qualora si ritenga opportuno procedere all'esecuzione di prove di conferma per l'accertamento dell'appartenenza al genere *Clostridium,* è necessario eseguire, sulle colonie rilevate, la colorazione di Gram e la prova della catalasi (14.1). Per una identificazione, a livello di specie, dei microrganismi isolati si possono utilizzare i kit miniaturizzati di prove biochimiche disponibili in commercio.
Trasferire la colonia da saggiare, mediante semina per strisciamento in superficie in due piastre contenenti agar nutritivo con sangue di coniglio (12.1.3) o in alternativa in due piastre di agar Columbia con 5% di sangue di montone (12.1.4). Incubare una piastra a 36±1°C per 24 ore, l'altra alla stessa temperatura per 24 ore, ma in anaerobiosi.
I microrganismi appartenenti al genere *Clostridium* cresceranno unicamente sul terreno incubato in anaerobiosi. Procedere allo svolgimento della prova della catalasi.

14.1 Prova della catalasi

La prova della catalasi serve per differenziare i batteri solfito-riduttori appartenenti al genere *Clostridium* (catalasi negativi) da quelli appartenenti al genere *Bacillus* (catalasi positivi).
Seminare la colonie da saggiare su agar nutritivo (12.1.3) e incubare a 36±1°C per 24±2 ore in anaerobiosi. Strisciare su un vetrino da microscopio una colonia in esame quindi ricoprire con una goccia di perossido d'idrogeno (12.1.6).
La reazione negativa, tipica del genere *Clostridium,* è evidenziata dalla mancata formazione di bolle (liberazione di gas).

15. Espressione dei risultati

Riportare il numero di spore di clostridi solfito riduttori come UFC/100 mL.
Dal numero di colonie caratteristiche contate e tenendo conto dei risultati delle prove di conferma, calcolare il numero di spore di clostridi presenti in 100 mL del campione in base alla seguente formula (1):

$$C = \frac{A \cdot N \cdot V_s \cdot F}{B \cdot V_t} \qquad (1)$$

dove:
C = numero di colonie che sono state confermate per 100 mL;
A = numero di colonie confermate;
B = numero di colonie da sottoporre a conferma;
N = numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana;
V_t = volume (mL) di campione analizzato;
V_s = volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 mL);
F = fattore di diluizione.

16. Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero di spore di clostridi solfito riduttori per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for examination of water and wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA).

KONEMAN S.D., ALLEN V.R., DOWELL Jr., JANDA W.M., SCHRECKENBERGER P.C. & WINN W.C. Jr. (1995): "*Testo atlante di microbiologia diagnostica*", II Ed., Delfino editore, Roma.

UNICHIM (1994): "*Acque destinate al consumo umano - Metodi Microbiologici*", Parte I, Manuale N. 168, Milano.

7070. *Aeromonas spp*

1. Introduzione

1.1 Generalità

I microrganismi appartenenti al genere *Aeromonas* sono bastoncelli motili e non motili, gram-negativi, ossidasi positivi, aerobi facoltativi o anaerobi; il metabolismo del glucosio è sia respiratorio che fermentativo. Attualmente la tassonomia del genere è in fase di revisione per quanto riguarda il rilievo delle caratteristiche fenotipiche e delle proprietà genetiche. Al momento è stata accertata l'esistenza di 15 gruppi di ibridizzazione non tutti distinguibili su base biochimica. La classificazione tradizionale riporta la distinzione tra *Aeromonas salmonicida*, specie psicrofila, e *A. hydrophila*, *A. sobria* e *A. caviae*, specie mesofile motili. Tuttavia, in attesa di una definitiva classificazione del genere, è stato suggerito di riportare le specie di *Aeromonas* sotto l'unico termine generico di "gruppo o complesso degli *A. hydrophila*", anche in attesa di risolvere le problematiche inerenti il ruolo che le diverse specie possono svolgere come patogeni. Alcuni genotipi sono infatti considerati responsabili di patologie (infezioni sistemiche e cutanee) per l'uomo e di recente l'OMS ha inserito *Aeromonas* nell'elenco dei potenziali agenti di gastroenteriti.
Il suo rilevamento nelle acque sembra seguire un andamento stagionale in relazione alla temperatura dell'acqua. Inoltre, in acque clorate la crescita di *Aeromonas* sembra sia in rapporto anche alla concentrazione di cloro. La sua presenza viene rilevata anche in assenza di *Escherichia coli* e difficile risulta stabilire un rapporto tra le sue densità e quelle degli indici di contaminazione fecale, soprattutto in acque poco inquinate e in acque trattate.

1.2 Obiettivo

Il metodo consente di valutare, in un volume noto di acqua, la concentrazione dei microrganismi appartenenti al gruppo degli *Aeromonas*.

1.3 Principio del metodo

La procedura analitica si basa sulla filtrazione su membrana e sul successivo conteggio dei microrganismi presenti in un volume noto del campione di acqua.

1.4 Campo di applicazione

La procedura analitica viene utilizzata per acque superficiali, di fiume, di lago e per acque reflue anche sottoposte a trattamento.

1.5 Volume da analizzare

Per l'analisi è necessario determinare il volume in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare. Per l'esame di acque reflue o comunque di bassa qualità è possibile analizzare anche diluizioni scalari del campione; mentre per acque già sottoposte a trattamento possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

3. Reattivi e terreni di coltura

3.1 Substrato di isolamento

3.1.1 m-Aeromonas Selective Agar Base

Composizione:

Triptosio	5	g
Estratto di lievito	2	g
Destrina	11,4	g
Cloruro di sodio	3	g
Cloruro di potassio	2	g
Solfato di magnesio	0,1	g
Cloruro ferrico	0,06	g
Sodio desossicolato	0,1	g
Blu di bromotimolo	0,08	g
Agar	13	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 8±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata e riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Sterilizzare in autoclave a 121±3°C per 15±1 minuti. Lasciare raffreddare fino a circa 50°C ed aggiungere sterilmente 1% di Ampicillina. Mescolare e distribuire in piastre Petri. Conservare il terreno sterilizzato, pronto per l'uso, a circa +4°C per non più di una settimana in condizioni ottimali.
Esistono in commercio diversi substrati usati per la crescita di *Aeromonas* che garantiscono buoni risultati in fase analitica. Qui viene riportata la composizione del m-Aeromonas Selective Agar Base. È necessario comunque tenere in considerazione che la scelta di un substrato o dell'altro può essere effettuata sulla base dell'esperienza dell'operatore a condizione che ciò non comporti alcun cambiamento delle caratteristiche di produttività.

3.1.2 Soluzione di Ampicillina all'1%

Composizione:

Ampicillina	5	mg
Acqua distillata	5	mL

L'antibiotico è anche disponibile in commercio in forma disidratata in fiale; in alternativa sciogliere l'ampicillina in acqua distillata e sterilizzare per filtrazione. Aggiungere al substrato di isolamento già sterilizzato in ragione di 1 mL/100 mL di terreno.

3.2 Substrato di crescita

3.2.1 Triptone Soia Agar

Composizione:

Triptone	15	g
Peptone di soia	5	g
Sodio cloruro	5	g
Agar	20	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,2±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata, riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Dopo avere sciolto la polvere sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di una settimana in condizioni ottimali.
Esistono in commercio diversi substrati non selettivi per la crescita dei microrganismi; qui viene riportata la composizione del Triptone Soia Agar. È necessario comunque tenere in considerazione che la scelta di un substrato o dell'altro può essere effettuata sulla base dell'esperienza dell'operatore a condizione che ciò non comporti alcun cambiamento delle caratteristiche di produttività.

3.3 Reattivo alla Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato

3.3.1 Soluzione di Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato all'1%

Composizione:

N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato	1	g
Acqua distillata	100	mL

Dischetti o tamponi adatti all'uopo sono anche disponibili in commercio; in alternativa sciogliere N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato in acqua distillata, preparando la soluzione al momento dell'uso.

Nota: *la N,N,N'N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato è classificata come sostanza pericolosa per la salute ai sensi della direttiva 67/548/CEE e successivi adeguamenti.*

4. Procedura

4.1 Filtrazione ed incubazione

Filtrare l'aliquota di campione attraverso una membrana di 47 mm di diametro (porosità nominale 0,45 μm) posta sul supporto dell'apparecchiatura di filtrazione, rispettando le comuni norme di asepsi. Trasferire sterilmente la membrana in piastre contenenti il substrato di isolamento (3.1.1) addizionato con ampicillina (3.1.2) evitando la formazione di bolle d'aria tra la membrana stessa e la superficie del terreno agarizzato. Incubare alla temperatura di 28±1°C per 24±2 ore.

4.2 Identificazione e conteggio delle colonie

Sul substrato di isolamento i microrganismi appartenenti al genere *Aeromonas* sviluppano, con viraggio del terreno, colonie di colore giallo, caratteristica dovuta alla fermentazione del-

la destrina, ben distinguibili da colonie di altri microrganismi che possono crescere sullo stesso terreno. In alcuni casi sono infatti state individuate colonie bianche (*Alcaligenes* sp.), rosse (*Serratia* sp.) e verdi (*Pseudomonas* sp.). Contare tutte le colonie gialle tipiche.

5. Conferma

Qualora si ritenga opportuno procedere all'esecuzione di prove di conferma per l'accertamento dell'appartenenza al genere *Aeromonas,* è necessario eseguire, sulle colonie rilevate, la colorazione di Gram e la prova della citocromossidasi. Per una identificazione, a livello di specie, dei microrganismi isolati si possono utilizzare i kit miniaturizzati di prove biochimiche disponibili in commercio che, tuttavia, attualmente permettono solo la differenziazione di *A. hydrophila/A. caviae* da *A. sobria*.
Isolare le colonie da sottoporre a conferma sul terreno Triptone Soia Agar (3.2.1) e incubare a 28±1°C per 24±2 ore. Procedere allo svolgimento della colorazione di Gram e della prova della citocromossidasi (5.1).

5.1 Prova della citocromossidasi

La prova permette di differenziare i microrganismi appartenenti al genere *Aeromonas* in base alla presenza dell'enzima citocromossidasi: *Aeromonas* è ossidasi-positivo.
Dal terreno Triptone Soia Agar (3.2.1) prelevare, con le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile la colonia cresciuta sul terreno e strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo (3.3.1) preparato al momento dell'uso o saggiare sui dischetti o con i tamponi adatti all'uopo distribuiti in commercio. Una reazione positiva si evidenzia quando una colorazione blu-violetto si sviluppa entro 10 secondi.

6. Espressione dei risultati

Riportare il numero di *Aeromonas* come UFC/100 mL.
Dal numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana e tenendo conto dei risultati delle prove di conferma, calcolare il numero di microrganismi presenti in 100 mL del campione in base alla seguente formula (1):

$$C = \frac{A \cdot N \cdot V_s \cdot F}{B \cdot V_t} \qquad (1)$$

dove:
C = numero di colonie che sono state confermate per 100 mL;
A = numero di colonie confermate;
B = numero di colonie da sottoporre a conferma;
N = numero di colonie caratteristiche contate sulla membrana;
V_t = volume (mL) di campione analizzato;
V_s = volume di riferimento per l'espressione dei risultati (100 mL);
F = fattore di diluizione.

7. Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

BIBLIOGRAFIA

BONADONNA L. & DI GIROLAMO I. (1994): "*Aeromonas* in acque potabili: un rischio reale o potenziale?", *Ann. Igiene e Sanità Pubblica*, **50**, 81-90.

HAVELAAR A.H., DURING M. & VERSTEEGH J.F.M. (1987): "Ampicillin-dextrin agar medium for the enumeration of *Aeromonas* species in water by membrane filtration, *Journal Applied Bacteriology*, **62**, 279-287.

HAVELAAR A.H. & VONK M. (1988): "The preparation of Ampicillin dextrin agar for the enumeration of *Aeromonas* in water, *Letters in Applied Microbioogy*, **7**, 169-171.

SEMPRONI M. & BONADONNA L. (1997): "Metodo per la ricerca e l'isolamento di Aeromonas sp in acque destinate al consumo umano", *Notiziario dei Metodi Analitici IRSA,* luglio 1997, 11-15.

7080. *Salmonella spp*

1. Introduzione

Il genere *Salmonella* comprende microrganismi bastoncellari appartenenti alla famiglia delle Enterobatteriacee, gram negativi, generalmente mobili con flagelli peritrichi, anaerobi facoltativi. Le salmonelle sono classificate in base ai caratteri sierologici che differenziano circa 2.000 tra tipi e sierotipi. Sono prevalentemente caratterizzate dalla presenza di due tipi di antigeni: antigeni somatici (O), termostabili e resistenti all'azione di acidi e alcooli, e antigeni ciliari (H), termolabili. *Salmonella typhi* ed altre salmonelle possiedono anche un antigene denominato Vi, strettamente correlato all'antigene somatico, ma diverso da questo in quanto termolabile. Sono microrganismi patogeni e possono essere strettamente adattati ad un particolare ospite o essere ubiquitari e ritrovarsi in ospiti diversi. L'infezione è a trasmissione fecale-orale o associata alla contaminazione di alimenti e di acqua. Nell'uomo può manifestarsi con febbri enteriche, gastroenteriti, setticemia e tifo.
Salmonella è ampiamente diffusa nell'ambiente dove può anche sopravvivere. La sua presenza nell'ambiente idrico rappresenta inequivocabilmente l'esistenza di una contaminazione fecale primaria (immissione diretta di scarichi fognari) o secondaria (dilavamento di suoli contaminati). Nelle acque reflue la presenza di *Salmonella* è variabile nelle densità in funzione delle patologie diffuse all'interno della popolazione.

1.2 Obiettivo

Il metodo consente di valutare, in un volume noto di acqua, la presenza o l'assenza di microrganismi appartenenti al genere *Salmonella*.

1.3 Principio del metodo

Il metodo proposto consente di valutare la Presenza/Assenza di *Salmonella* in un determinato volume di acqua. La procedura analitica consiste in una serie di fasi successive che possono comprendere Prearricchimento, Arricchimento, Isolamento ed eventualmente, Conferma biochimica e Conferma sierologica.

1.4 Campo di applicazione

La procedura analitica viene utilizzata per acque superficiali, di fiume, di lago e per acque reflue anche sottoposte a trattamento.

2. Volume da analizzare

Per l'analisi è necessario determinare il volume in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare. Per acque reflue o comunque di bassa qualità generalmente è necessario analizzare un volume minimo pari a 10 mL, mentre per acque già sottoposte a trattamento possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

3. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

4. Reattivi e terreni di coltura

4.1 Substrato di prearricchimento

4.1.1 - Acqua Peptonata Tamponata

Composizione:

Peptone	10	g
Sodio cloruro	5	g
Disodio idrogeno fosfato·12H_2O	9	g
Potassio diidrogeno fosfato	1,5	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,2±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Dopo avere sciolto la polvere distribuire in beute e sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti. Conservare a circa +4°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

4.2 Substrato di arricchimento

4.2.1 Brodo di arricchimento di Rappaport Vassiliadis

Composizione:

Peptone di soia	5	g
Sodio cloruro	8	g
Potassio diidrogeno fosfato	1,6	g
Magnesio cloruro·6H_2O	40	g
Verde malachite	40	mg
Acqua distillata	1000	mL
pH 5,2±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Distribuire in tubi e sterilizzare a 115±3°C per 15±1 minuti. Conservare a circa +4°C per non più di una settimana in condizioni ottimali. L'aggiunta al brodo di arricchimento di 10 µg/mL di sodio novobiocina può migliorare il recupero di *Salmonella*.

4.2.2 Brodo di base al Tetrationato

Composizione:

Peptone	5	g
Sali di bile	1	g
Sodio tiosolfato	30	g
Calcio carbonato	10	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 8,4±0,2		

Il terreno completo deve essere preparato al momento dell'uso. Si trova anche in commercio

in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Raffreddare sotto i 60°C e aggiungere 2 mL di una soluzione di iodio preparata sciogliendo 6 g di cristalli di iodio e 5 g di ioduro di potassio in 20 mL di acqua distillata. Non riscaldare il terreno dopo l'aggiunta di iodio. Distribuire in tubi sterili. Il terreno è adatto alla ricerca anche di *S. typhi*.

4.3 Substrati di isolamento

4.3.1 Hektoen Enteric Agar

Composizione:

Peptone	12	g
Estratto di lievito	3	g
Sali biliari	9	g
Lattosio	12	g
Saccarosio	12	g
Salicina	2	g
Sodio cloruro	5	g
Sodio iposolfito	5	g
Citrato ferrico ammoniacale	1,5	g
Agar	13,5	g
Blu di bromotimolo	64	mg
Fucsina acida	40	mg
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,6±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Non sterilizzare. Distribuire in piastre di Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.
Esistono in commercio diversi substrati usati per l'isolamento di *Salmonella* che garantiscono buoni risultati in fase analitica anche se non esiste un unico substrato in grado di far crescere tutti i sierotipi di *Salmonella* presenti. È necessario comunque tenere in considerazione che la scelta di un substrato o dell'altro può essere effettuata sulla base dell'esperienza dell'operatore a condizione che ciò non comporti alcun cambiamento delle caratteristiche di produttività.

4.3.2 Xilosio Lisina Desossicolato

Composizione:

Xilosio	3,5	g
L-Lisina	5	g
Lattosio	7,5	g
Saccarosio	7,5	g
Cloruro di sodio	5	g
Estratto di lievito	3	g
Rosso fenolo	0,08	g
Desossicolato di sodio	2,5	g
Tiosolfato di sodio	6,8	g
Citrato di ferro ammoniacale	0,8	g
Agar	13,5	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,4±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni

della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Non sterilizzare. Distribuire in piastre di Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

4.3.3 Rambach Agar

Composizione:

Glicole propilenico	10,5	g
Estratto di lievito	2	g
Peptone	5	g
Sodio desossicolato	1	g
Sodio cloruro	5	g
Rosso neutro	0,03	g
Cromogeno	1,5	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,3±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Riscaldare agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Non sterilizzare. Distribuire in piastre di Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.
È un terreno colturale particolarmente selettivo per *Salmonella,* le cui colonie sono ben individuabili.

4.4 Substrato di crescita

4.4.1 Triptone Soia Agar

Composizione:

Triptone	15	g
Peptone di soia	5	g
Sodio cloruro	5	g
Agar	20	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,3±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti. Distribuire in piastre di Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

4.5 Reattivo alla Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato

4.5.1 Soluzione di Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato all'1%

Composizione:

N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato	1	g
Acqua distillata	100	mL

Dischetti o tamponi adatti all'uopo sono anche disponibili in commercio; in alternativa sciogliere N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato in acqua distillata, preparando la soluzione al momento dell'uso.

Nota: *la N,N,N'N' -tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato è classificata come sostanza pericolosa per la salute ai sensi della direttiva 67/548/CEE e successivi adeguamenti.*

4.6 Substrato per la prova della fermentazione dei carboidrati

4.6.1 Agar al ferro di Kligler

Composizione:

Estratto di carne	3	g
Estratto di lievito	3	g
Peptone	20	g
Sodio cloruro	5	g
Lattosio	10	g
Glucosio	1	g
Ferro citrato	0,3	g
Sodio tiosolfato	0,3	g
Agar	12	g
Rosso fenolo	50	mg
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,4±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Distribuire in provette e, dopo sterilizzazione a 121±3°C per 15±1 minuti, lasciare solidificare in posizione inclinata per ottenere una superficie a becco di clarino. Conservare a circa +4°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

4.7 Substrato per la prova della decarbossilazione della lisina

4.7.1 Agar al ferro e lisina

Composizione:

Casitone	5	g
Estratto di lievito	3	g
Destrosio	1	g
L-lisina	10	g
Ferro ammonio citrato	0,5	g
Agar	13,5	g
Sodio tiosolfato	40	mg
Porpora bromocresolo	20	mg
Acqua distillata	1000	mL
pH 6,2±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Distribuire in provette e, dopo sterilizzazione a 121±3°C per 12±1 minuti, lasciare solidificare in posizione inclinata per ottenere una superficie a becco di clarino. Conservare a circa +4°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

5. Procedura

5.1 Fase di prearricchimento

Consiste in una fase di rivitalizzazione dei microrganismi in idoneo brodo di coltura non selettivo; è una fase che può essere omessa sulla base dell'esperienza dell'operatore a condizione che ciò non comporti modifiche dei risultati ottenuti. La procedura di seguito riportata tuttavia propone lo svolgimento di tutte le fasi.
Filtrare 1000 mL di campione attraverso una membrana di 47 mm di diametro (porosità nominale 0,45 μm) posta sul supporto dell'apparecchiatura di filtrazione, rispettando le comuni norme di asepsi. Se è necessario per presenza di particolato in sospensione, la filtrazione può essere eseguita su più membrane. Trasferire sterilmente la membrana/e in 100 mL di Acqua Peptonata Tamponata (4.1.1) contenuta in beuta e incubare a 36±1°C per 18-24 ore.

5.2 Fase di arricchimento

Eseguire l'inoculo di un'aliquota del campione in Brodo di arricchimento di Rappaport Vassiliadis (4.2.1) o in alternativa nel Brodo alla Selenite e Cistina (4.2.2). Quest'ultimo è raccomandato qualora debba essere ricercata in particolare *S. typhi*. Incubare il Brodo di Rappaport Vassiliadis a 42±1°C per 24+24 ore.
Incubare il Brodo alla Selenite e Cistina a 36±1°C per 24+24 ore.

5.3 Fase di isolamento ed identificazione delle colonie

Dal brodo di arricchimento (4.2.1 o 4.2.2) eseguire, prelevando un'ansata, 2 subcolture per strisci multipli sui terreni di isolamento: la prima dopo 24±2 ore di incubazione del brodo, la seconda dopo 48±2 ore. Incubare le piastre a 36±1°C per 24 ore.
Su Hektoen Enteric Agar le colonie sospette di *Salmonella* si presentano verdi con margini netti con o senza centro nero.
Su Xilosio Lisina Desossicolato le colonie sospette di *Salmonella* si presentano rosse con centro nero, lucide, convesse e con margini netti.
Su Rambach Agar il 97-99% delle colonie di *Salmonella* si presentano rosse. *S. paratyphi* e *S. typhi* crescono invece come colonie incolori. Alcuni stipiti di *Pseudomonas* possono crescere come colonie rosse; tuttavia la loro presenza può essere messa in evidenza con la prova della citocromossidasi (6.1).

6. Conferma biochimica

Qualora si ritenga opportuno, è possibile procedere all'esecuzione di prove di conferma per l'accertamento dell'appartenenza al genere *Salmonella* delle colonie sospette eseguendo la prova della citocromossidasi (6.1) della fermentazione dei carboidrati (6.2) e della decarbossilazione della lisina (6.3).
Successivamente l'identificazione biochimica può essere completata con i kit miniaturizzati di prove biochimiche disponibili in commercio.
Prima di effettuare ciascuna prova si suggerisce, onde verificarne la purezza, di subcoltivare le colonie sospette su Triptone Soia Agar (4.4.1) e incubare a 36±1°C per 24±2 ore. Eseguire le prove su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

6.1 Prova della citocromossidasi

La prova permette di differenziare i microrganismi appartenenti al genere *Salmonella* da quelli appartenenti al genere *Pseudomonas* che possono produrre colonie simili sul terreno di isolamento. Le salmonelle sono ossidasi-negative.
Dal terreno Triptone Soia Agar (4.4.1) prelevare, con le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile, la colonia cresciuta e strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo (4.5.1) pre-

parato al momento dell'uso o saggiare sui dischetti o con i tamponi adatti all'uopo distribuiti in commercio. Una reazione negativa si evidenzia quando non si produce alcuna colorazione; se positiva si sviluppa entro 10 secondi una colorazione blu-violetto.

6.2 Prova della fermentazione dei carboidrati

Dal terreno Triptone Soia Agar (4.4.1) prelevare con un'ansa sterile la colonia sospetta e trasferire, per infissione e successivo strisciamento sulla superficie inclinata del terreno Agar al ferro di Kligler (4.6.1). Incubare a 36±1°C per 18-24 ore. È essenziale che i risultati siano registrati dopo 18-24 ore di incubazione. Sebbene *Citrobacter* possa dare le stesse reazioni di *Salmonella,* per la interpretazione dei risultati si devono annotare le seguenti reazioni:
Utilizzazione dei carboidrati su Kligler Iron Agar

- Reazione sulla superficie inclinata	Acidità: Alcalinità:	colore giallo colore rosso
- Reazione di profondità	Acidità: Alcalinità:	colore giallo colore rosso
- Produzione di gas	Presente: Assente	bolle o rottura dell'agar
- Produzione di H_2S:	Presente: Assente	annerimento del terreno

Le reazioni dopo 18-24 ore di incubazione a 36±1°C per alcune delle specie di *Salmonella* sono le seguenti:

Microrganismo	Superficie	Profondità	Gas	H_2S
Salmonella spp.	Rosso	Giallo	+	+
S. typhi	Rosso	Giallo	-	+
S. paratyphi	Rosso	Giallo	-	-

6.3 Prova della decarbossilazione della lisina

Dal terreno Triptone Soia Agar (4.4.1) prelevare con un'ansa sterile la colonia sospetta e trasferire, per infissione e successivo strisciamento sulla superficie inclinata del terreno Agar al ferro e lisina (4.7.1). Incubare a 36±1°C per 18-24 ore.
I microrganismi appartenenti al genere *Salmonella* producono una reazione alcalina (violetta) sia del becco, sia del cilindro; una colorazione gialla (acida) indica una reazione negativa. Gli stipiti che producono idrogeno solforato determinano un annerimento del terreno.

7. Conferma sierologica

Qualora si ritenga opportuno si può procedere alla tipizzazione delle colonie mediante conferma sierologica. Gli stipiti selezionati in base alle caratteristiche colturali e biochimiche proprie di *Salmonella* possono essere tipizzati in base alla classificazione di Kauffmann-White utilizzando sieri polivalenti. L'ulteriore tipizzazione sierologica può essere effettuata con sieri monovalenti anti-O e anti-H oppure inviando gli stipiti ai centri di riferimento per la *Salmonella*.
Per lo svolgimento della procedura si rimanda ai testi specifici.

8. Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come *Salmonella*: Assente o Presente nel volume esaminato e, se del caso, il sierotipo individuato.

9. Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come presenza/assenza di *Salmonella* per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard Methods for examination of water and wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA).

BONADONNA L., LATINI M., DI GIROLAMO I. & OTTAVIANI M. (1994): "Valutazione della contaminazione microbiologica di fanghi di depurazione di reflui civili: problemi legati alle metodiche di analisi", Rapporti ISTISAN 94/17, Roma, 84 p.

IRSA (1983): "Metodi analitici per i fanghi", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **64**, Roma.

7090. *Vibrio spp*

1 . Introduzione

I microrganismi appartenenti al genere *Vibrio* sono ampiamente distribuiti nell'ambiente acquatico. A differenza della maggior parte dei patogeni enterici che vengono veicolati nell'ambiente idrico attraverso gli scarichi, i microrganismi compresi in questo genere sono stati isolati, oltre che da acque reflue e acque estuariali, anche da acque dolci superficiali non contaminate da scarichi fecali.
Vibrio cholerae è la specie più importante del gruppo che fa parte della famiglia delle *Vibrionaceae*. Al genere appartengono microrganismi motili, bastoncelli gram-negativi, asporigeni e anaerobi facoltativi. Diverse sono le specie, alcune delle quali alofile. Di *V. cholerae* sono stati individuati più di 130 sierogruppi e prima del 1992 solo il sierogruppo O1 era stato associato a epidemie e casi di colera. Dal 1993 tuttavia il sierogruppo O139 (non-O1) è ritenuto responsabile delle epidemie registrate nei Paesi dell'area orientale. I biotipi non-O1, ampiamente diffusi nell'ambiente acquatico, possono essere responsabili di sindromi simili al colera e causa di epidemie circoscritte e le manifestazioni cliniche, in generale, possono essere riconducibili a infezioni localizzate dei tessuti molli e delle mucose, infezioni sistemiche e gastroenteriti acute.
La clorazione delle acque è tuttora considerata una efficace misura di prevenzione per il controllo del colera. Tuttavia è stato osservato che fenotipi rugosi sono in grado di sopravvivere in presenza di 2 mg/L di cloro residuo libero con un tempo di contatto di 30 minuti.

1.2 Obiettivo

Il metodo consente di valutare, in un volume noto di acqua, la presenza o l'assenza di microrganismi appartenenti al genere *Vibrio*.

1.3 Principio del metodo

Il metodo proposto consente di valutare la Presenza/Assenza di *Vibrio* in un determinato volume di acqua. La procedura analitica consiste in una serie di fasi successive che possono comprendere Arricchimento, Isolamento ed eventualmente, Conferma biochimica e Conferma sierologica.

1.4 Campo di applicazione

La procedura analitica viene utilizzata per acque superficiali, di fiume, di lago e per acque reflue anche sottoposte a trattamento.

2. Volume da analizzare

Per l'analisi è necessario determinare il volume in base alla tipologia e alla qualità dell'acqua da esaminare. Per acque reflue o comunque di bassa qualità generalmente è necessario analizzare un volume minimo pari a 10 mL, mentre per acque già sottoposte a trattamento possono essere analizzate diluizioni minori e comunque aliquote diverse.

3. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio.

4. Reattivi e terreni di coltura

4.1 Brodo di arricchimento

4.1.1 Acqua Peptonata Alcalina

Composizione:

Peptone	10	g
Sodio cloruro	10	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 8,5±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione, ma evitando il surriscaldamento. Agitare frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Raffreddare e modificare il pH con l'aggiunta di un'aliquota di NaOH 0,1 N. Distribuire in beute in ragione di 100 mL/beuta e sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti Conservare a circa +4°C per non più di quattro settimane in condizioni ottimali.

4.1.2 Soluzione di idrossido di sodio 0,1 N

Composizione:

Idrossido di sodio	4	g
Acqua distillata	1000	mL

Agitare vigorosamente con barretta magnetica fino a completa dissoluzione.

4.2 Substrato di isolamento

4.2.1 Agar al Tiosolfato Citrato Bile e Saccarosio

Composizione:

Estratto di lievito	5	g
Peptone	10	g
Sodio tiosolfato	10	g
Sodio citrato	10	g
Sali di bile	8	g
Saccarosio	20	g
Sodio cloruro	10	g
Citrato ferrico	1	g
Agar	14	g
Blu di bromotimolo	40	mg
Blu timolo	40	mg
Acqua distillata	1000	mL
pH 8,6±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione, ma evitando il surriscaldamento. Agitare frequentemente per ottenere la completa soluzione

degli ingredienti, raffreddare. Se necessario modificare il pH con l'aggiunta di un'aliquota di NaOH 0,1 N (4.1.2). Non sterilizzare. Distribuire in piastre di Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di quattro settimane in condizioni ottimali.
È stato osservato che la selettività dei diversi terreni TCBS presenti sul mercato può essere diversa: ciò può portare a risultati diversi nella crescita del microrganismo ricercato. Con prove di controllo di qualità verificare le rese quali-quantitative dei substrati.

4.3 Substrati di crescita

4.3.1 Triptone Soia Agar con NaCl all'1%

Composizione:

Triptone	15	g
Peptone di soia	5	g
Sodio cloruro	5	g
Agar	20	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,3±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Aggiungere 1 mL di una soluzione di NaCl per ogni 100 mL di terreno preparato. Sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti Distribuire in piastre di Petri e lasciare solidificare. Conservare a circa +4°C per non più di due settimane in condizioni ottimali.

4.3.2 Brodo al Triptone di Soia con NaCl all'1%

Composizione:

Digerito pancreatico di caseina	17	g
Digerito papainico di farina di soia	3	g
Sodio cloruro	5	g
Dipotassio idrogeno fosfato	2,5	g
Destrosio	2,5	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,3±0,2		

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare e agitare frequentemente per ottenere la completa soluzione degli ingredienti. Aggiungere 1 mL di una soluzione di NaCl per ogni 100 mL di terreno preparato. Distribuire in tubi aliquote di circa 10 mL. Sterilizzare a 121±3°C per 15±1 minuti Conservare a circa +4°C per non più di un mese.

4.4 Reattivo alla Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato

4.4.1 Soluzione di Tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato all'1%

Composizione:

N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato	1	g
Acqua distillata	100	mL

Dischetti o tamponi adatti all'uopo sono anche disponibili in commercio; in alternativa sciogliere N,N,N',N'-tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato in acqua distillata, preparando la soluzione al momento dell'uso.

Nota: *la N,N,N'N' -tetrametil-parafenilendiamina dicloridrato è classificato come sostanza pericolosa per la salute ai sensi della direttiva 67/548/CEE e successivi adeguamenti.*

4.5 Vibriostatico

In commercio esistono dischetti da 10 μg e da 150 μg di vibriostatico 0/129 (2,4-diamino-6,7-diisopropil-pteridina fosfato).

5. Procedura

5.1 Fase di Arricchimento

Consiste in una fase di rivitalizzazione dei microrganismi in idoneo brodo di coltura non selettivo. Filtrare un volume di campione attraverso una membrana di 47 mm di diametro (porosità nominale 0,45 μm) posta sul supporto dell'apparecchiatura di filtrazione, rispettando le comuni norme di asepsi. Se è necessario per presenza di particolato in sospensione, la filtrazione può essere eseguita su più membrane. Trasferire sterilmente la membrana/e in 100 mL di Acqua Peptonata Alcalina (4.1.1). Incubare a 36±1°C per 6-8 ore, fino a un massimo di 18 ore.

5.2 Fase di Isolamento ed identificazione delle colonie

Dal brodo di arricchimento (4.1.1) prelevare un'ansata dalla pellicola formata sulla superficie del brodo ed effettuare uno striscio sul terreno di isolamento (4.2.1). Incubare a 36±1°C per 18-20 ore. È consigliabile contemporaneamente prelevare 10 mL di brodocoltura dal brodo di arricchimento (4.1.1) e inoculare in un'altra beuta contenente 100 mL di Acqua Peptonata Alcalina (4.1.1). Incubare a 36±1°C per 6-8 ore, fino a un massimo di 18 ore. Dopo incubazione prelevare un'ansata dalla pellicola formata sulla superficie del brodo ed effettuare uno striscio su un'altra piastra Petri contenente il terreno di isolamento (4.2.1). Incubare a 36±1°C per 18-20 ore.
I microrganismi appartenenti al genere *Vibrio* sviluppano sul substrato di isolamento (4.2.1) colonie gialle con centro opaco e margini traslucidi, piatte, con diametro di 2-4 mm e colonie verdi, piatte, con diametro di 1-3 mm.

6. Conferma biochimica

Per l'accertamento dell'appartenenza al genere *Vibrio* delle colonie sospette procedere all'esecuzione delle seguenti prove di conferma: colorazione di Gram, prova della citocromossidasi (6.2), prova della suscettibilità al vibriostatico (6.3).
Successivamente l'identificazione biochimica può essere completata con i kit miniaturizzati di prove biochimiche disponibili in commercio.
Prima di effettuare ciascuna prova si suggerisce, onde verificarne la purezza, di subcoltivare le colonie sospette su Triptone Soia Agar con NaCl all'1% (4.3.1) e incubare a 36±1°C per 24±2 ore. Eseguire le prove su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

6.1 Prova della citocromossidasi

La prova permette di differenziare i microrganismi appartenenti al genere *Vibrio* in base alla presenza dell'enzima citocromossidasi. *Vibrio* spp è ossidasi-positivo ad eccezione di *V. metschnichovii* che è ossidasi negativo.
Dal terreno Triptone Soia Agar con NaCl all'1% (4.3.1) prelevare, con le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile, la colonia cresciuta e strisciare su una carta da filtro imbibita del reattivo (4.4.1) preparato al momento dell'uso o saggiare sui dischetti o con i tamponi adatti all'uopo distribuiti in commercio. Una reazione positiva si evidenzia quando si produce, entro 10 secondi, una colorazione blu-violetto.

6.2 Prova della suscettibilità al vibriostatico

La prova può permettere di differenziare i microrganismi appartenenti al genere *Vibrio* da quelli appartenenti al genere *Aeromonas*. *Vibrio* spp è in genere suscettibile al vibriostatico. Dal terreno Triptone Soia Agar con NaCl all'1% (4.3.1*)* prelevare, seguendo le usuali regole di asepsi, con un'ansa sterile, la colonia da saggiare e inoculare in Brodo al Triptone di Soia con NaCl all'1% (4.3.2). Incubare a 36±1°C per 18-24 ore. La crescita è evidenziata dalla torbidità del terreno. Imbibire un tampone sterile nella brodocoltura e strisciare abbondantemente sul terreno Triptone Soia Agar con NaCl all'1% (4.3.1). Sulla superficie dell'Agar applicare, ad adeguata distanza, un dischetto da 10 μg e uno da 150 μg di vibriostatico O/129 (4.5). Incubare a 36±1°C per 18-24 ore.
Dopo incubazione verificare l'eventuale presenza o assenza di aloni di inibizione intorno ai dischetti. *Vibrio* spp è generalmente sensibile al vibriostatico, mentre *Aeromonas* è resistente. Recentemente sono stati riportati casi in cui biotipi di *V. cholerae* sono risultati resistenti al vibriostatico (es.: *V. cholerae* O139).

7. Conferma sierologica

Qualora si ritenga opportuno si può procedere alla tipizzazione delle colonie mediante conferma sierologica. Gli stipiti selezionati in base alle caratteristiche colturali e biochimiche proprie di *Vibrio* possono essere tipizzati utilizzando sieri polivalenti. L'ulteriore tipizzazione sierologica può essere effettuata con sieri monovalenti oppure inviando gli stipiti ai centri di riferimento per la tipizzazione di *Vibrio*.
Per lo svolgimento della procedura si rimanda ai testi specifici.

8. Espressione dei risultati

Riportare il risultato ottenuto come *Vibrio*: Assente o Presente in 1 L e, se del caso, il sierogruppo individuato.

9. Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come presenza/assenza di *Vibrio* per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

BIBLIOGRAFIA

KAY B.A., BOPP C.A. & WELLS J.G. (1994): "Isolation and identification of *Vibrio cholerae O1* from fecal specimens". *In: Vibrio cholerae and cholera: molecular to global perspectives.* I.K. Wachsmuth, P.A. Blake and O. Olsvik (Ed.) Washington D.C.: American Society for Microbiology.

KAYSNER C.A. & HILL W.E. (1994): "Toxigen *Vibrio cholerae O1* in food and water". In *Vibrio cholerae and cholera: molecular to global perspectives.* I.K. Wachsmuth, P.A. Blake and O. Olsvik (Ed.) Washington D.C.: American Society for Microbiology.

7100. Uova di elminti

1. Introduzione

1.1 Generalità

Nel passato, sotto il termine Elminti veniva raggruppato un insieme eterogeneo di animali o stadi di animali vermiformi che non sembravano possedere caratteri distintivi tali da farli comprendere in altri gruppi zoologici. Attualmente l'Organizzazione Mondiale della Sanità prende in considerazione gli Elminti che interessano la parassitologia umana distinguendo due gruppi di organismi differenti, appartenenti ai phyla Platyhelmintha e Nematoda. Del gruppo degli Elminti fa parte anche il phylum Acantocephala, in cui sono compresi organismi parassiti degli animali.
Il phylum Platyhelmintha è suddiviso nelle classi dei Turbellari - la gran parte a vita libera - dei Trematodi e dei Cestodi - parassiti dell'uomo e degli animali.
La presenza nelle acque degli stadi larvali infettivi di Trematodi è limitata dalla loro scarsa capacità di sopravvivenza nell'ambiente: poche ore se non incontrano l'ospite (spesso necessitano di un ospite intermedio e di uno definitivo) in cui compiono il loro ciclo vitale. L'uomo costituisce un ospite inadeguato. Anche recentemente in Europa, Stati Uniti, Australia, Nuova Zelanda e Giappone sono stati segnalati casi di patologie cutanee associate ad immersione in ambienti di acqua dolce dove erano contemporaneamente presenti gli stadi larvali natanti e gli ospiti specifici. In Italia evidenze epidemiologiche risalgono a trenta-quaranta anni fa. Rari casi sono stati riportati più di recente in acque lacustri (un caso nel 1993).
Cisti e uova di Cestodi hanno quale modo di trasmissione prevalente la via fecale-orale e alimentare.
Il phylum Nematoda è considerato uno dei gruppi di organismi più diffuso in natura: ne sono state descritte 12.000 specie, molte delle quali vivono nell'acqua dolce o marina, in acque termali o ad alta salinità. Altre hanno il loro habitat nel suolo o nella materia organica in decomposizione e alcune possono fare parte del benthos e del plancton marino. Circa 5.000 specie parassitano le piante e gli animali, ma la distribuzione e la diffusione dei parassiti (una dozzina di specie) che hanno un riscontro nella patologia umana è limitata, ad oggi, alla fascia tropicale e subtropicale interessando vaste aree del continente africano, asiatico e alcune zone dell'Europa nord–orientale.

1.2 Obiettivo

Il metodo consente di valutare, in un volume noto di acqua, la eventuale presenza di uova di elminti.

1.3 Principio del metodo

La procedura analitica prevede una fase di sedimentazione e una serie di centrifugazioni seguite da una flottazione e dall'evidenziazione delle uova al microscopio. La procedura non ne consente la determinazione a livello di specie.
Esiste la possibilità di utilizzare, durante la fase di flottazione, reagenti diversi. È necessario comunque tenere in considerazione che la scelta di un reagente o dell'altro può essere effettuata sulla base dell'esperienza dell'operatore purché vengano mantenute le caratteristiche di produttività del metodo.
È da tenere in conto che valori elevati di torbidità possono diminuire l'efficienza di recupero.

Con questa procedura è possibile ottenere una percentuale di recupero pari a circa il 70% quando la concentrazione delle uova è di 100 per litro.

1.4 Campo di applicazione

La procedura analitica viene utilizzata per acque superficiali, di fiume, di lago e per acque reflue anche sottoposte a trattamento.

2. Volume da analizzare

Il volume da analizzare è pari a 1-10 litri per l'esame di acque superficiali, reflue grezze, ma per acque sottoposte a trattamento, in relazione alla loro qualità, possono essere analizzate aliquote diverse.

3. Strumentazione e vetreria

Per lo svolgimento dell'analisi, oltre alla normale attrezzatura di base di laboratorio, è necessario disporre di:

- centrifuga a rotore basculante;
- coni Imhoff;
- contenitori da centrifuga da 50 mL con fondo conico;
- microscopio.

4. Reattivi

4.1 Soluzione di Formaldeide al 10%

Composizione:

Formaldeide 37%	27	mL
Acqua distillata	73	mL

Miscelare in acqua distillata la formaldeide al 37% con le dovute precauzioni sotto cappa chimica.

4.2 Soluzione di Lugol

Composizione:

I_2	4	g
KI	6	g
Acqua distillata	100	mL

Sciogliere i componenti nell'acqua distillata. Aggiungere al campione al momento del prelievo. Conservare al buio.

4.3 Soluzione di sodio nitrato

Composizione:

$NaNO_3$	60	g
Acqua distillata	100	mL

Preparare una soluzione satura di sodio nitrato sciogliendo il sodio nitrato in acqua distillata.

5. Procedura

5.1 Fissazione del campione

Fissare il campione con formaldeide (4.1) operando preferibilmente al momento del campionamento e con le dovute precauzioni.

5.2 1ª Sedimentazione

Aggiungere 1 mL di soluzione di Lugol (4.2) per ogni 100 mL di campione.
Distribuire il campione, in base al volume da analizzare, in uno o più beaker o, preferibilmente in coni Imhoff. Lasciare sedimentare per tutta la notte e procedere allo svolgimento dell'analisi il giorno successivo.

5.3 Centrifugazione

Dopo la fase di sedimentazione eliminare il sovranatante e trasferire un massimo di 10 mL di "pellet" in tubi da centrifuga da 50 mL. Lavare le pareti del contenitore dove è avvenuta la sedimentazione con acqua distillata per raccogliere ogni eventuale residuo e aggiungerla al "pellet" nei tubi. Centrifugare per 10 minuti a 700 g e successivamente scartare il sovranatante.

5.4 Flottazione

Al "pellet" residuo aggiungere un volume (1:2) di una soluzione satura di $NaNO_3$ (d=1,3) (4.3) e centrifugare per 3 minuti a 1000 g.
Ripetere l'intera procedura per un totale di tre volte e, ogni volta, rimuovere accuratamente il sovranatante ponendolo in beaker, o preferibilmente, in cono Imhoff contenente 1 L di acqua.

5.5 2ª Sedimentazione

Lasciare sedimentare nel recipiente per circa 12 ore. Successivamente eliminare accuratamente il sovranatante e trasferire il "pellet" in tubi da centrifuga. Lavare le pareti del contenitore dove è avvenuta la sedimentazione con acqua distillata per raccogliere ogni eventuale residuo e aggiungerla al "pellet" nei tubi. Centrifugare per 4 minuti a 1000 g.

6. Osservazione al microscopio

Dopo l'ultima centrifugazione raccogliere il "pellet" su un vetrino ed esaminare al microscopio a 100 ingrandimenti verificando la presenza di uova di Elminti.

7. Espressione dei risultati

Riportare il risultato come Presenza/Assenza di uova di Elminti nel volume esaminato.

8. Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come presenza/assenza di uova di elminti per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

BIBLIOGRAFIA

SATCHWELL M.G. (1986): "An adaptation of concentration techniques for the enumeration of parasitic Helminth eggs from sewage sludge, *Wat. Res.*, **7**, 813-816.

TEICHNANN A. (1986): "Zur methodik des quantitativen nachweis von helminthenstation in konnunalen abwassern", *Angewandte Parasitologie*, **27**, 145-150.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (1989): "*Guidelines for the safe use of wastewater and excreta in agriculture and aquaculture*".

7110. Batteriofagi

1. Introduzione

1.1 Generalità

I batteriofagi strutturalmente sono costituiti da una molecola di acido nucleico protetta da un involucro proteico.
Similmente ai virus animali, possono moltiplicarsi esclusivamente all'interno della cellula ospite, metabolicamente attiva e competente.
La loro distribuzione nell'ambiente non ha ancora fornito dati ben precisi ma la loro presenza è stata individuata in tutti i mezzi ove è presente una forma di vita batterica. Ogni "habitat" presenta una popolazione fagica di batteri autoctoni ed una popolazione fagica proveniente da altri ambienti. Negli ambienti acquatici i fagi infettanti i batteri del genere *E. coli* (colifagi ed F-specifici) sono i più rappresentati e, dato l'interesse che essi ricoprono in qualità di indicatori potenziali di una contaminazione virale di origine fecale, sono stati i più studiati e ricercati. La loro distribuzione nel tratto digerente dell'uomo e degli animali è stata più volte studiata ed è stato dimostrato che il 23,5% di campioni di feci umane contiene fagi di *E.coli* con una concentrazione pari a 10^5 UFP per grammo di feci. Un altro batteriofago presente in grande quantità nel tratto intestinale è il fago specifico del *Bacteroides fragilis* (B 40-8), batterio anaerobio.
La capacità di sopravvivenza e di moltiplicazione dei fagi nell'ambiente è un aspetto importante; esso è in relazione alla presenza, in un determinato "habitat", del batterio ospite, dell'età fisiologica del batterio stesso e della densità rispettivamente del batterio ospite e del suo fago. Ciò è chiaramente valido per i fagi infettanti i batteri autoctoni; per i fagi specifici dei batteri alloctoni invece, la situazione è meno chiara. I colifagi somatici riescono a moltiplicarsi nell'ambiente in quanto riconoscono il loro recettore di attacco sulla superficie esterna del corpo batterico a temperature relativamente basse (15°÷45°C) quali quelle riscontrabili in un ambiente idrico; per i colifagi F-specifici (F-plus) invece la moltiplicazione nell'ambiente è possibile solo utilizzando come recettore il sex-pilus. La sintesi di questo recettore si verifica a temperature superiori a 30°C, ragion per cui, la moltiplicazione nell'ambiente di questi fagi è realizzabile soltanto se il loro batterio ospite ha sintetizzato precedentemente il sex-pilus nell'intestino degli omeotermi, prima di essere versato nel mezzo idrico.
I fagi che infettano il *Bacteroides fragilis*, infine, non sono in grado di moltiplicarsi nell'ambiente perchè il loro batterio-ospite è metabolicamente attivo soltanto in condizione di anaerobiosi ed in presenza di alcuni fattori di crescita specifici, condizioni che non sono riproducibili in un ambiente idrico.
La sopravvivenza dei batteriofagi nell'ambiente idrico è superiore a quella dei batteri autoctoni ed in particolare a quella dei batteri indicatori di contaminazione fecale. Allo stesso modo dei virus animali la durata della loro sopravvivenza dipende dalla presenza di sostanza organica nel mezzo e dalla loro associazione con le particelle solide, dalla temperatura, dalla loro esposizione ai raggi ultravioletti, dal pH, ecc.
Nel corso dell'ultimo decennio i batteriofagi sono stati proposti come indicatori di contaminazione virale dei mezzi idrici e anche come indicatori di efficacia dei processi di depurazione e disinfezione delle acque.
I colifagi possono essere isolati e quantificati con metodi semplici e poco costosi, i tempi di risposta sono più brevi che per gli enterovirus, alcuni colifagi sono più resistenti degli enterovirus all'inattivazione e alla disinfezione.
Alcuni Autori, in seguito a recenti studi, hanno proposto l'uso del fago specifico del *Bacteroides fragilis* come indicatore di contaminazione fecale in quanto specifico del tratto digerente umano.

1.2 Obiettivo

Il metodo analitico consente di valutare e quantificare la presenza di batteriofagi in un volume noto di acqua.

1.3 Principio del metodo

La procedura di analisi si basa sulla messa in evidenza della popolazione fagica mediante metodi qualitativi o quantitativi.

1.4 Campo di applicazione

La procedura analitica viene utilizzata per acque superficiali sorgive, di fiume, di lago e per acque reflue anche sottoposte a trattamento.

2. Reattivi e terreni di coltura

2.1 Estratto di carne al 10%, pH 9,0

Composizione:

Estratto di carne	10	g
Acqua distillata	100	mL
pH 9,0±0,2		

In una beuta sterile reidratare la polvere provvedendo al completo scioglimento con l'aiuto di un agitatore magnetico. Portare il pH al valore desiderato con l'aggiunta di idrossido di sodio (NaOH). Sterilizzare in autoclave per 15±1 minuti a 121±3°C.
La soluzione, se conservata sterilmente, può essere mantenuta per diversi mesi a temperatura ambiente.

2.2 Estratto di carne al 3% pH 7,2 e pH 9,5

Composizione:

Estratto di carne	3	g
Acqua distillata	100	mL

In una beuta sterile reidratare la polvere, provvedendo al completo scioglimento con l'aiuto di un agitatore magnetico. Portare il pH al valore desiderato con l'aggiunta di idrossido di sodio (NaOH).
Sterilizzare in autoclave per 15±1 minuti a 121±3°C.
La soluzione se conservata sterilmente può essere mantenuta per diversi mesi a temperatura ambiente.

2.3 Soluzione di Formaldeide allo 0,1%

Composizione:

Formaldeide (soluzione al 37%)	1,35	mL
Acqua distillata	500	mL

Preparare al momento dell'uso e scartarla dopo l'utilizzo.

2.4 Soluzione di Idrossido di sodio (NaOH) 0,1 N

Composizione:

Idrossido di sodio	4	g
Acqua distillata	1	L

Agitare vigorosamente con barretta magnetica fino a completa dissoluzione. Scartare dopo l'utilizzo.

2.5 Tampone glicina 0,25 M pH 9,5

Composizione:

Glicina	18,76	g
Acqua distillata	1000	L
pH 9,5±0,2		

In una beuta sterile reidratare la polvere provvedendo al completo scioglimento con l'aiuto di un agitatore magnetico. Portare il pH al valore desiderato con l'aggiunta di idrossido di sodio (NaOH).
Sterilizzare in autoclave per 15±1 minuti a 121±3°C.
La soluzione se conservata sterilmente può essere mantenuta per diversi mesi a temperatura ambiente.

2.6 Brodo Triptone

Composizione:

Triptone	10	g
Destrosio	1	g
Cloruro di sodio	5	g
Acqua distillata	1	L
pH 7,0±0,2		

Sciogliere i costituenti in acqua distillata, sterilizzare in autoclave per 15±1 minuti a 121±3°C e mantenere a circa +4°C. Utilizzare non oltre i 14 giorni.

2.7 Brodo Triptone doppio concentrato

Composizione:

Triptone	20	g
Destrosio	2	g
Cloruro di sodio	10	g
Acqua distillata	1	L
pH 7,0±0,2		

Sciogliere i costituenti in acqua distillata, sterilizzare in autoclave per 15±1 minuti a 121±3°C e mantenere a circa +4°C. Utilizzare non oltre i 14 giorni.

2.8 Agar triptone: primo strato

Composizione:

Triptone	10	g
Destrosio	1	g
NaCl	5	g
Agar	15	g
Acqua distillata	1	L
pH 7,0±0,2		

La miscela di terreno così composta non è reperibile in commercio; è possibile acquistare i singoli costituenti che verranno mescolati al momento della preparazione del terreno.
Reidratare in acqua distillata i costituenti, secondo la formula sopra riportata, fino a completo scioglimento in agitazione. Sterilizzare in autoclave per 15±1 minuti a 121±3°C, raffreddare a circa 50°C e distribuire in capsule Petri da 90 mm di diametro. Lasciare solidificare. Le piastre possono essere conservate per una settimana a circa +4°C.

2.9 Agar Triptone molle: secondo strato

Composizione:

Triptone	10	g
Destrosio	1	g
Cloruro di sodio	5	g
Agar	7	g
Acqua distillata	1	L
pH 7,0±0,2		

Preparare il terreno in piccoli matracci nella quantità sufficiente per l'analisi quotidiana e autoclavare per 15±1 minuti a 121±3°C. Mantenere il terreno a 55±1°C fino al momento dell'uso.
Aggiungere, prima della semina, acido nalidixico alla concentrazione di 100 mg/L per la ricerca dei colifagi somatici, oppure streptomicina e ampicillina, entrambi alla concentrazione di 0,015 g/L, per la ricerca dei fagi F-plus.

2.10 Soluzione tampone per fago

Composizione:

Na_2HPO_4	7	g
KH_2PO_4	3	g
NaCl	5	g
Acqua distillata	1	L

Sciogliere i costituenti in acqua distillata e autoclavare a 121±3°C per 15±1 minuti. Lasciare raffreddare e aggiungere:

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,1 M	10 mL (2.12)
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,01 M	10 mL (2.13)

Queste soluzioni vanno preparate separatamente, autoclavate a 121±3°C per 15±1 minuti e conservate a circa +4°C per non oltre 6 mesi in condizioni ottimali.

2.11 Solfato di magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) allo 0,1 M

Composizione:

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2,46	g
Acqua distillata	100	mL

Sciogliere la polvere in acqua fino alla completa dissoluzione, sterilizzare in autoclave per 15±1 minuti a 121±3°C e conservare a circa +4°C per non oltre 6 mesi in condizioni ottimali.

2.12 Cloruro di calcio ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) allo 0,01 M

Composizione:

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0,15	g
Acqua distillata	100	mL

Sciogliere la polvere in acqua fino alla completa dissoluzione, sterilizzare in autoclave per 15±1 minuti a 121±3°C e conservare a circa +4°C per non oltre 6 mesi in condizioni ottimali.

2.13 Supplementi selettivi: antibiotici

Gli antibiotici sono disponibili in commercio in forma liofilizzata.
Preparare uno stock iniziale per ogni antibiotico e conservarlo a circa -20°C.
Lo "stock" si conserva non oltre i sei mesi in condizioni ottimali, suddiviso in aliquote.

2.13.1 Acido nalidixico per la ricerca di Colifagi somatici: "stock" iniziale

Composizione:

Acido nalidixico	1	g
Acqua distillata	10	mL

Sciogliere l'antibiotico fino alla completa dissoluzione; sterilizzare per filtrazione. Dividere in aliquote da 1 mL. Conservare a circa -20°C.

2.13.2 Streptomicina per la ricerca di fagi F-plus: "stock" iniziale

Composizione:

Streptomicina	0,15	g
Acqua distillata	10	mL

Sciogliere l'antibiotico fino alla completa dissoluzione; sterilizzare per filtrazione. Dividere in aliquote da 1 mL. Conservare a circa -20°C in condizioni ottimali.

2.13.3 Ampicillina per la ricerca di fagi F-plus: "stock" iniziale

Composizione:

Ampicillina	0,15	g
Acqua distillata	10	mL

Sciogliere l'antibiotico fino alla completa dissoluzione; sterilizzare per filtrazione. Dividere in aliquote da 1 mL. Conservare a circa -20°C in condizioni ottimali.

2.13.4 Vancomicina: "stock" iniziale

Composizione:

Vancomicina	75	mg
Acqua distillata	10	mL

Sciogliere l'antibiotico fino alla completa dissoluzione; sterilizzare per filtrazione. Dividere in aliquote da 1 mL. Conservare a circa -20°C in condizioni ottimali.

2.13.5 Kanamicina: "stock" iniziale

Composizione:

Kanamicina	1	g
Acqua distillata	10	mL

Sciogliere l'antibiotico fino alla completa dissoluzione; sterilizzare per filtrazione. Dividere in aliquote da 1 mL. Conservare a circa -20°C in condizioni ottimali.

2.14 Brodo di crescita del Bacteroides fragilis doppio concentrato

Composizione:

Casitone	20	g	
Peptone di carne	20	g	
Estratto di lievito	4	g	
Cloruro di sodio	10	g	
L cisteina cloridrato	1	g	
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,05 g/mL)	2	g	(2.16)
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,12 g/mL)	2	mL	(2.17)
Glucosio	3,6	g	
Acqua distillata	1	L	

Dopo aver sciolto i costituenti in acqua distillata sterilizzare per 15±1 minuti a 121±3°C in autoclave, raffreddare a circa 50°C. Successivamente aggiungere sterilmente:

Emina 0,1%	20	mL (2.18)
Carbonato bisodico 1 M	50	mL (2.19)

Aggiustare sterilmente il pH a 7,0±0,2 con HCl 35% (circa 5-6 mL/L) senza superare il valore limite.
Il terreno, senza emina, può essere conservato a circa +4°C per una settimana in condizioni ottimali.
È consigliabile preparare la quantità di terreno da usare per l'analisi giornaliera senza conservarlo successivamente.

2.15 Cloruro di Calcio biidrato ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,05 g/mL)

Composizione:

$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	5	g
Acqua distillata	100	mL

Sciogliere la polvere fino a completa dissoluzione con l'aiuto di un agitatore magnetico. Autoclavare a 121±3°C per 15±1 minuti. Conservare a circa +4°C non oltre sei mesi in condizioni ottimali.

2.16 Solfato di magnesio eptaidrato $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,12 g/mL)

Composizione:

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	12	g
Acqua distillata	100	mL

Sciogliere la polvere fino a completa dissoluzione con l'aiuto di un agitatore magnetico. Autoclavare a 121±3°C per 15±1 minuti. Conservare a circa +4°C per non oltre sei mesi.

2.17 Emina allo 0,1%

Composizione:

NaOH	0,02	g
Emina	0,1	g
Acqua distillata	100	mL

Sciogliere su agitatore magnetico NaOH in acqua fino a completa dissoluzione (15 minuti circa), aggiungere l'emina e lasciare in agitazione magnetica per circa 2 ore fino a completa dissoluzione.
Sterilizzare per filtrazione (porosità nominale 0,22 µm). Conservare a temperatura ambiente per non oltre i sei mesi in condizioni ottimali.

2.18 Carbonato bisodico (Na_2CO_3) 1 M

Composizione:

Na_2CO_3	106,0	g
Acqua distillata	1	L

Sciogliere la polvere in acqua fino a completa dissoluzione e sterilizzare per filtrazione (porosità nominale 0,22 µm). Conservare a temperatura ambiente per non oltre sei mesi in condizioni ottimali.

2.19 Brodo di crescita del Bacteroides fragilis

Composizione:

Casitone	10	g	
Peptone di carne	10	g	
Estratto di lievito	2	g	
Cloruro di sodio	5	g	
L-cisteina monoidrato	0,5	g	
Glucosio	1,8	g	
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1	mL	(2.16)
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,12 g/mL)	1	mL	(2.17)
Acqua distillata	1	L	

Dopo aver sciolto i costituenti in acqua distillata sterilizzare per 15±1 minuti a 121±3°C in autoclave e raffreddare a circa 50°C. Successivamente aggiungere sterilmente:

Emina 0,1%	10	mL	(2.18)
Na_2CO_3 1 M	25	mL	(2.19)

Aggiustare sterilmente il pH a 7,0 ± 0,2 con HCl 35% (circa 2-3 mL/L).
Il terreno, senza emina, può essere conservato a circa +4°C per non più di una settimana in condizioni ottimali. È consigliabile preparare la quantità di terreno da usare per l'analisi giornaliera senza conservarlo successivamente.

2.20 Terreno di isolamento primo strato

Composizione:

Agar sangue base n° 2	40	g	
L-cisteina monoidrato	0,5	g	
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,05g/mL)	1	mL	(2.16)
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1	mL	(2.17)
Acqua distillata	1	L	

Sciogliere i costituenti in acqua distillata fino a completo scioglimento. Autoclavare per 15±1 minuti a 121±3°C. Distribuire in capsule Petri e lasciare solidificare. Il terreno può essere conservato a circa +4°C per non più di una settimana in condizioni ottimali.

2.21 Agar molle secondo strato

Composizione:

Casitone	10	g	
Peptone di carne	10	g	
Estratto di lievito	2	g	
Cloruro di sodio	5	g	
L-cisteina monoidrato	0,5	g	
Glucosio	1,8	g	
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ (0,05 g/mL)	1	mL	(2.16)
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,12 g/mL)	1	mL	(2.17)
Agar	7	g	
Acqua distillata	1	L	

Dopo aver sciolto i costituenti in acqua distillata sterilizzare per 15±1 minuti a 121±3°C in autoclave e raffreddare a circa 55±1°C. Successivamente aggiungere sterilmente:

Emina 0,1%	10	mL	(2.18)
Na_2CO_3 1 M	25	mL	(2.19)

Aggiustare sterilmente il pH a 7,0±0,2 con HCl 35% (circa 2-3 mL/L).
Mantenere il terreno a 55±1°C fino al momento dell'uso.
È consigliabile preparare la quantità di terreno da usare per l'analisi giornaliera senza conservarlo successivamente.
Per evitare contaminazioni è bene aggiungere al terreno 100 mg/mL di solfato di kanamicina (2.14.5) e 7,5 mg/mL di Vancomicina (2.14.4). Il batterio rivelatore raccomandato è resistente ad entrambi gli antibiotici.

3. Strumentazione e vetreria

Oltre alla normale attrezzatura di laboratorio è necessario disporre di:

- agitatore magnetico;
- apparato per filtrazione con pompa da vuoto;
- apparato per ultrafiltrazione;
- bagno termostatato;
- barrette magnetiche;
- bottiglie sterili per prelievo;
- capsule Petri da 90 mm di diametro;
- membrane filtranti per decontaminazione (low binding protein);
- membrane filtranti per recupero fagi;
- pipette automatiche;

- provette sterili;
- sistema completo per incubazione in anaerobiosi;
- termostato regolabile;
- "vortex".

4. Procedura

La ricerca dei batteriofagi in campioni di acque reflue richiede una serie di operazioni, così come per gli enterovirus, che devono essere adattate al tipo di fago che si intende ricercare. Benché la quantità dei fagi in un ambiente idrico è di gran lunga superiore a quella degli enterovirus, in alcuni tipi di campioni è necessaria una concentrazione di essi.
La maggior parte dei metodi utilizzati per concentrarli si basa sul principio dell'adsorbimento su diversi materiali così come avviene per i virus animali; in una seconda fase si provvede ad eluire in un piccolo volume i fagi adesi al materiale adsorbente. È importante tenere conto di alcune caratteristiche dei fagi, in particolare la loro sensibilità al pH. Alcuni colifagi presenti nell'acqua sono inattivati a pH 11,5; il fago specifico del *B. fragilis* è sensibile invece a valori di pH vicini a 3,0 che generalmente vengono impiegati in alcuni metodi di concentrazione.
Per questi motivi è bene utilizzare dei metodi che non prevedano l'uso di eluenti con valori di pH estremi.

4.1 Volume da analizzare

La diversa natura dei campioni ambientali impone delle differenze nella scelta dei volumi da sottoporre ad analisi, volumi che devono tenere conto del grado di inquinamento, accertato o presunto, della tipologia dell'acqua e della destinazione d'uso. Per acque reflue, i volumi variano da pochi mL a 2-3 L in base al trattamento depurativo eventualmente subito (es. acque reflue in entrata e in uscita dagli impianti di depurazione). Per le acque superficiali, i volumi da analizzare dovranno essere necessariamente più elevati.

4.2 Concentrazione per adsorbimento-eluizione

Questo metodo consente di concentrare i fagi a un volume massimo di 2-3 litri di acqua in un volume finale di eluente pari a 3-5 mL.

4.2.1 Filtri elettronegativi

Questo modello di membrane filtranti presenta una superficie a carica elettrica negativa. A valori di pH prossimi alla neutralità le particelle virali vengono respinte mentre, riducendo i valori di pH intorno a 3,5 si ottiene una inversione della carica elettrica superficiale dei virus che ne permette il loro adsorbimento. Aggiungendo cationi bi- o tri-valenti al campione da concentrare, è possibile migliorare la capacità adsorbente del filtro. Questa tecnica, largamente utilizzata per il recupero degli enterovirus da campioni ambientali, può essere applicata per il recupero dei batteriofagi sebbene il rendimento sia minore; molti fagi infatti sono rapidamente inattivati dai bassi valori di pH. Adottando dei valori di pH intorno a 3,8-4,0 e controllando accuratamente il valore raggiunto durante le singole fasi della procedura di recupero, si ottengono risultati più soddisfacenti. Un rendimento maggiore è stato dimostrato per valori di pH intorno a 6,0 ed in presenza di ioni Mg^{2+} ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0,2 M). Dopo aver filtrato il campione per pressione positiva attraverso il filtro, si procede alla eluizione con un piccolo volume (da 3 a 5 mL) di una soluzione ad alta concentrazione di proteine (3% di estratto di carne) con un valore di pH intorno a 9,0 (2.2). Si neutralizza velocemente l'eluato con HCl 1 N ed il concentrato così ottenuto è pronto per essere analizzato.

4.2.2 Filtri elettropositivi

L'adsorbimento dei fagi ai filtri elettropositivi è ottimo mentre la loro completa eluizione risulta piuttosto difficile. I migliori risultati si ottengono adottando come eluente una soluzione di estratto di carne al 3% con un valore di pH compreso tra 7.0 e 9.0.
Una delle metodiche già descritte in letteratura prevede l'uso di filtri elettropositivi del tipo VIROSORB 1 MDS. In commercio è comunque possibile reperire altri tipi di filtri a carica superficiale modificata.
Il campione viene filtrato per pressione positiva attraverso un pacchetto di tre filtri 1 MDS. I fagi adsorbiti vengono eluiti con 20 mL di estratto di carne al 10% pH 9.0 (2.1), e l'eluato raccolto, neutralizzato con HCl 1N. L'eluato viene mescolato con due volumi di una soluzione satura di ammonio è centrifugato a 14500g/20'/+4°C. Il "pellet" è quindi risospeso in 2 mL di acqua distillata sterile.

4.2.3 Altri filtri

Si tratta di membrane filtranti di materiale inorganico con diametro di 47 mm e con porosità di 0,1 o 0,2 μm del tipo ANODISC™ che non presentano cariche elettriche di superficie. Consentono di concentrare il campione in condizioni di pH neutro e per questo motivo sono particolarmente consigliati per il recupero dei fagi B40-8.

4.3 Metodo di concentrazione per Ultrafiltrazione a Flusso tangenziale

L'ultrafiltrazione è un processo di separazione delle particelle in funzione del solo peso molecolare; esistono diverse membrane e cartucce con tagli molecolari ("nominal molecular weight limit") da 1.000 sino a 1.000.000 di dalton. La funzione della membrana è quella di porre una barriera tra le sostanze che riescono ad attraversare le membrane e le altre, a peso molecolare più elevato rispetto al taglio molecolare ("cut-off"), che sono ritenute, ad es. i virus. I batteriofagi in particolare vengono concentrati non per adsorbimento su membrane ma per riduzione progressiva del volume del campione dovuto a perdita di acqua, sali e soluti in base al "cut-off" scelto. Attualmente in commercio è possibile reperire due tipi di membrane: cellulosa rigenerata e polisulfone.
Si consiglia l'uso di membrane con taglio molecolare pari a100.000 dalton.
Per migliorare il rendimento (recupero) della membrana o cartuccia è preferibile pretrattare con estratto di carne al 3% pH 7,0±0,2 (2.2) prevenendo così l'adsorbimento aspecifico dei fagi.
La procedura analitica è di seguito descritta:

- montare l'ultrafiltro secondo le istruzioni della casa produttrice;
- pretrattare il sistema con estratto di carne a pH 7,0±0,2 (2.2) facendolo ricircolare per 5 minuti;
- far circolare il campione alle seguenti condizioni operative: 10-12 psi in entrata;
- fermare l'apparecchio quando il recipiente del campione è quasi vuoto. In questo caso il volume del campione è rappresentato dal solo volume di riempimento dei tubi e di imbibizione dell'ultrafiltro. Svuotare il sistema completamente e raccogliere il campione;
- lavare l'ultrafiltro con una soluzione di estratto di carne al 3% pH 9,5±0,2 (2.2) utilizzando un volume pari a 3/4 dell'ultraconcentrato;
- riunire l'ultraconcentrato con la soluzione di lavaggio;
- neutralizzare il pH del campione-concentrato finale con acido cloridrico (HCl).

Il campione può essere ulteriormente concentrato, se necessario, utilizzando sistemi di ultrafiltrazione in grado di trattare volumi minori.
A fine concentrazione:

- lavare l'ultrafiltro con 1-2 L di acqua distillata;

- far circolare in continuo per almeno 15 minuti una soluzione di NaOH 0,1 N (2.5);
- lavare l'ultrafiltro con 2-3 L di acqua distillata.

A questo punto l'ultrafiltro può essere utilizzato per un nuovo campione o conservato per successive analisi.

4.4 Mantenimento e conservazione degli ultrafiltri

Le membrane o cartucce per ultrafiltrazione a flusso tangenziale possono essere utilizzate a lungo e per diversi campioni se adeguatamente rigenerate e conservate e come di seguito descritto:

- lavare l'ultrafiltro con 1-2 L di acqua distillata;
- far circolare in continuo per almeno 15 minuti una soluzione di NaOH 0,1 N (2.5);
- lavare l'ultrafiltro con 2-3 L di acqua distillata;
- far circolare in continuo una soluzione di formaldeide allo 0,1% (2.4);
- spegnere la pompa ed estrarre l'ultrafiltro cercando di conservare quanta più formaldeide possibile all'interno dell'ultrafiltro stesso;
- mantenerlo a circa +4°C.

5. Rivelazione dei diversi tipi di batteriofagi

Tutti i campioni di provenienza ambientale contengono consorzi batterici propri che possono in qualche modo interferire con la rivelazione dei batteriofagi; pertanto è necessario inattivare o allontanare tale popolazione microbica prima di effettuare la messa in evidenza dei fagi.
La decontaminazione può essere effettuata con metodi diretti che prevedono o la filtrazione su membrane di nitrato di cellulosa (porosità nominale 0,22 μm) preventivamente trattate con estratto di carne al 3% pH 7,2 (2.2) oppure trattando il campione con 1/3 del suo volume di cloroformio, agitando energicamente per 10 minuti ed allontanando la fase organica per centrifugazione. Quest'ultimo trattamento, pur distruggendo la maggior parte dei batteri, provoca comunque un'inattivazione parziale dei fagi. I metodi indiretti, invece, possono essere attuati nella fase di rivelazione dei fagi aggiungendo al mezzo di coltura un antibiotico in grado di inattivare i batteri contaminanti ma non la crescita del batterio rivelatore che presenta plasmidi di resistenza specifici.
Per quanto riguarda l'evidenziazione dei fagi i metodi possono essere sia qualitativi che quantitativi.
Il classico metodo utilizzato per stabilire la presenza dei fagi (metodo qualitativo) si basa su una fase di arricchimento del fago e sua successiva messa in evidenza. Ad un volume noto di campione da analizzare si aggiunge un eguale volume di terreno di coltura idoneo nel quale è stato fatto precedentemente crescere il batterio indicatore. Dopo incubazione, al fine di favorire la moltiplicazione dei fagi presenti, una piccola quantità della coltura viene decontaminata e sottoposta al test di rivelazione.
La ricerca quantitativa delle particelle fagiche in un campione ambientale può essere effettuata con due diversi metodi: il metodo delle placche di lisi e il metodo dell'MPN ("Most Probable Number").
La tecnica delle placche di lisi è quella più usata in laboratorio e deriva dal metodo del doppio strato di agar.
Si mescola un adeguato volume del campione da analizzare con dell'agar molle, mantenuto nella fase liquida; si aggiunge la sospensione batterica indicatrice e, dopo leggera agitazione, il "mix" viene versato su uno strato di terreno agarizzato precedentemente fatto solidificare in capsule Petri.
Dopo l'incubazione si osservano e si enumerano le placche di lisi: ognuna di esse corrisponde ad una particella di fago infettivo (Unità Formanti Placca-UFP).

6. Colifagi somatici

Il batterio indicatore raccomandato è *E. coli* C ATCC 13706; è possibile utilizzare un ceppo derivato da esso purché resistente all'acido nalidixico. L'antibiotico viene aggiunto al terreno alla concentrazione finale di 100 mg/mL, partendo da uno "stock" precedentemente preparato e sterilizzato per filtrazione (2.14.1).
Al terreno di coltura può essere aggiunto agar-agar nella proporzione variabile secondo l'uso: agar del primo strato 1,5% (2.9) e agar secondo strato (o molle) 0,5% (2.10).

6.1 Procedura dell'analisi qualitativa

In un adeguato recipiente sterile mescolare:

- un volume di campione (a);
- un egual volume di terreno liquido doppio concentrato (b) (2.7);
- un volume pari al 12% di a+b della coltura del batterio rivelatore in fase esponenziale di crescita (D.O.=0,3 a 620 nm).

Incubare a 36±1°C per 16-18 ore. Prelevare una aliquota (circa 1 mL) della coltura ottenuta e decontaminarla con cloroformio. Mescolare 3 mL di agar molle (terreno di crescita con l'aggiunta di 0,5% di agar) (2.10) mantenuto a circa 45°C con 0,2 mL di una brodocoltura del batterio rivelatore in fase esponenziale di crescita. Versare in una capsula di Petri contenente un primo strato agarizzato del terreno di crescita (1,5% di agar) (2.9). Dopo solidificazione deporre una goccia della coltura decontaminata sulla superfice dell'agar. Lasciare asciugare e incubare a 36±1°C per almeno 8 ore. In caso di presenza di fago si osserverà un'area di lisi intorno alla goccia depositata.

6.2 Espressione dei risultati

Il risultato è espresso come presenza/assenza in un determinato volume di campione analizzato.

6.3 Procedura dell'analisi quantitativa

In un tubo sterile mescolare:

- 2,5 mL di agar molle (0,5% di agar) mantenuto a 45°C (2.10);
- 0,5 mL della coltura del batterio rivelatore in fase esponenziale di crescita (D.O.=0,3 a 620 nm);
- 100 mL del campione da analizzare precedentemente decontaminato per filtrazione.

Mescolare e versare su un primo strato di terreno di crescita fatto solidificare in una capsula Petri (1,5% agar) (2.9). Dopo solidificazione incubare a 36±1°C. Le placche sono già visibili dopo 6-8 ore di permanenza a 36±1°C.

6.4 Espressione dei risultati

Contare le placche di lisi dopo 18-20 ore di incubazione. Esprimere il risultato in UFP (Unità Formanti Placca) in un determinato volume di campione analizzato.

7. Colifagi f- specifici (f-plus)

Il batterio rivelatore, raccomandato per questa determinazione, deriva da *E. coli* K 12 (Hfr) che presenta i plasmidi di resistenza per la streptomicina e l'ampicillina.

Il terreno di crescita consigliato è identico a quello descritto per i colifagi somatici. È necessario aggiungere all'agar molle (2.10) i due antibiotici prima detti alla concentrazione di 0,015 g/L per entrambi (2.14.2-2.14.3).
Le fasi operative (analisi qualitativa e quantitativa) sono uguali a quelle descritte per i colifagi somatici (6.1-6.4)

8. B40-8, Fago del *Bacteroides fragilis*

Il batterio rivelatore consigliato è il *Bacteroides fragilis* HSP 40.
Per evitare le contaminazioni è consigliabile aggiungere al terreno 100 mg per mL di solfato di Kanamicina (2.14.5) e 7,5 mg per mL di Vancomicina (2.14.4). Il batterio raccomandato è resistente ad entrambi gli antibiotici.
È necessario lavorare in condizioni di assoluta anaerobiosi date le caratteristiche anaerobiche del batterio. Per l'isolamento del fago su terreno agarizzato si utilizzano per l'incubazione delle giare per anaerobiosi; per le colture in terreno liquido invece si possono utilizzare provette con tappo a vite completamente riempite di terreno liquido.

8.1 Procedura dell'analisi qualitativa

In un recipiente sterile mescolare:

- un volume di campione da analizzare (a);
- un egual volume di terreno liquido doppio concentrato (b) (2.15);
- un volume pari al 12% a+b della coltura del batterio rivelatore in fase esponenziale di crescita (D.O.=0,3 a 620 nm). Incubare a 36±1°C in condizioni di anaerobiosi per 18 ore circa.

Dopo l'incubazione una piccola quantità della coltura, preventivamente decontaminata con cloroformio, viene sottoposta al "test" di conferma come di seguito descritto.
In una capsula Petri, contenente un primo strato di terreno agarizzato (terreno di crescita all'1,5% di agar) (2.21), versare 3 mL di agar molle (terreno di crescita allo 0,5% di agar) (2.22) mantenuto a 45°C mescolato con 0,2 mL di una brodocoltura in fase esponenziale di crescita del batterio rivelatore. Lasciare solidificare e deporre una goccia della coltura in esame, precedentemente decontaminata, sulla superficie dell'agar; incubare per almeno 8 ore a 36±1°C in condizioni di anaerobiosi. In presenza di fago si osserverà un'area di lisi intorno alla goccia depositata.

8.2 Espressione dei risultati

Esprimere il risultato come presenza/assenza di batteriofagi in un determinato volume di campione.

8.3 Procedura dell'analisi quantitativa

La procedura è uguale a quella già descritta per i colifagi e gli F-specifici (F-plus) (6.3) eccetto che per l'incubazione che è effettuata in giare per anaerobiosi.

8.4 Espressione dei risultati

Contare le placche di lisi dopo 18-20 ore di incubazione. Esprimere il risultato in UFP (Unità Formanti Placca) in un determinato volume di campione analizzato.

BIBLIOGRAFIA

DEBARTOLOMEIS J. & CABELLI V.J. (1991): "Evaluation of an *Escherichia coli* host strain for enumeration of F-male-specific bacteriophages", *Appl. Environ. Microbiol.,* **57**, 1301.

DIVIZIA M., DONIA D., GABRIELI R., RUSCIO V. & PANÀ A. (1997): "Valutazioni relative ad un nuovo sistema di ultrafiltrazione per la concentrazione di enterovirus e batteriofagi", *Igiene e Sanità Pubblica,* **53**, 315.

DONIA D., DIVIZIA M. & PANÀ A. (1998): "Analysis of concentration methods for bacteriophages", *Igiene Moderna*, **109**, 1.

DONIA D., DIVIZIA M., PANÀ A., GABRIELI R., GASBARRO M., CAPUANI L. & MORELLI A.L. (1999): "Presence of bacteriophages in different stages of wastewater treatment", *Igiene Moderna*, **111**, 1-13.

GABRIELI R., DIVIZIA M., DONIA D., RUSCIO V., BONADONNA L., DIOTALLEVI C., VILLA L., MANZONE G. & PANÀ A.: (1997): "Evaluation of the wastewater treatment plant of Rome airport", *Water Sci. Tech.*, **35**, 193-196.

HAVELAAR A.H. (1993): "Bacteriophages as models of human enteric viruses in the environment", *ASM News*, **59**, 614.

TARTERA C., ARAUJO R., MICHEL T. & JOFRE J. (1992): "Culture and decontamination methods affecting enumeration of phages infecting Bacteroides fragilis in sewage", *Applied and Environmental Microbiology*, **58**, 2670.

TARTERA C. & JOFRE J. (1987): "Bacteriophages active against *Bacteroides fragilis* in sewage-polluted waters", *Applied and Environmental Microbiology*, **53**, 1632.

7120. Enterovirus

1. Introduzione

1.1 Generalità

Il termine enterovirus, che comprende Poliovirus, Echovirus, Coxsackievirus e il virus dell'epatite A, non deve essere confuso con il termine virus enterici che, diversamente, comprende la totalità dei virus reperibili nell'ambiente. I virus enterici sono eliminati dall'uomo per via fecale e possono, mediante acque ed alimenti contaminati, infettare soggetti recettivi. I virus enterici, appartengono a 6-8 famiglie differenti mentre nel complesso sono oltre 100 i sierotipi responsabili di malattia nell'uomo; sono tutti parassiti endocellulari ovvero necessitano di una linea cellulare su cui moltiplicarsi. Dal punto di vista analitico al momento non esiste una linea cellulare in grado di favorire la moltiplicazione di tutti i virus enterici e mentre alcuni sono capaci di moltiplicarsi su diverse linee cellulari (Poliovirus, Echovirus, Coxsackievirus), altri si moltiplicano con notevole difficoltà (virus dell'epatite A, Rotavirus). Esiste un terzo gruppo di virus che non è in grado di moltiplicarsi sulle linee cellulari attualmente in uso nei laboratori (Astrovirus, virus dell'epatite E, Adenovirus 40-41).
L'analisi virologica pone una serie di problemi, diversi rispetto a quelli che si incontrano per l'analisi batteriologica, che si identificano in: a) volumi da analizzare, b) procedure da adottare per la concentrazione dei campioni, c) isolamento su sistemi cellulari ed identificazione dei virus isolati.
I volumi che vengono utilizzati nell'analisi virologica delle acque sono nettamente superiori a quelli utilizzati nell'analisi batteriologica: pochi litri per le acque reflue, decine-centinaia di litri per le acque superficiali, sino a mille ed oltre litri per le acque potabili. È evidente che campioni di tali dimensioni non possono essere trasportati in laboratorio ma necessariamente si deve procedere ad una concentrazione su campo (concentrazione primaria) e successiva eluizione della membrana e/o cartuccia in laboratorio (concentrazione secondaria). Le stesse metodiche da adottare (filtrazione su membrane piane a carica superficiale elettropositiva o elettronegativa, ultrafiltrazione, ecc.) dipendono strettamente, oltre che dal tipo di acque da analizzare, anche dalle personali esperienze. L'isolamento su sistemi cellulari, per quei virus di cui è nota una linea cellulare suscettibile, presenta problemi legati alla necessità di diluire il campione al fine di ridurre la tossicità, alla necessità di usare più linee cellulari a seconda dei virus che si intendono ricercare, ecc. In ultimo, merita particolare attenzione il problema legato all'isolamento ed identificazione dei virus eventualmente presenti. Le metodiche classiche di sieroneutralizzazione con antisieri specifici, "test" immunoenzimatici per la ricerca di antigeni virali ("enzyme-linked immunosorbent assay", ELISA) o "test" di immunofluorescenza sia diretta che indiretta sono stati in parte superati dai più rapidi e moderni test di biologia molecolare, quali il "test" di ibridazione molecolare e il "test" di reazione a catena della polimerasi ("Polymerase Chain Reaction", PCR).
Al momento lo svolgimento dell'analisi virologica delle acque è richiesto per il controllo delle acque di balneazione (assenza di enterovirus in 10 litri), degli escavi di fondali marini destinati al ripascimento di litorali e delle acque potabili tra i parametri occasionali C4 del DPR 236/88.

1.2 Obiettivo

I metodi di seguito descritti consentono di valutare la presenza di enterovirus in un volume noto di acqua.

1.3 Principio del metodo

Le procedure descritte permettono di determinare la presenza di virus enterici in un volume noto di acqua con tecniche quantitative (Unità Formanti Placche per volume o UFP/volume) e qualitative (presenza/assenza) tramite fasi di concentrazione, eluizione e identificazione.

1.4 Campo di applicazione

La procedura analitica viene utilizzata per acque superficiali sorgive, di fiume, di lago e per acque reflue anche sottoposte a trattamento.

2. Reattivi e terreni di coltura

2.1 Sodio tiosolfato

Composizione:

$Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$	0,5	g
Acqua distillata	100	mL

Sciogliere con barretta magnetica e sterilizzare per filtrazione. La soluzione di sodio tiosolfato va aggiunto alla concentrazione finale di 50 mg/L.

2.2 Estratto di carne al 3% pH 7,2 (2.2a) e pH 9,5 (2.2b)

Composizione:

Estratto di carne	3	g
Acqua distillata	100	mL

Agitare vigorosamente con barretta magnetica. Portare il pH al valore desiderato con aggiunta di idrossido di sodio o acido cloridrico, sterilizzare in autoclave (121±3°C per 15±1 minuti).
La soluzione se conservata sterilmente può essere mantenuta per diversi mesi a temperatura ambiente.

2.3 Soluzione di idrossido di sodio (NaOH) 0,1M

Composizione:

NaOH	0,4	g
Acqua distillata	100	mL

Sciogliere l'idrossido di sodio in acqua su agitatore magnetico.

2.4 Soluzione di acido cloridrico (HCl) 0,1 M

Composizione:

Formaldeide	13,5	mL
Acqua distillata	500	mL

Miscelare l'acido cloridrico con acqua.

2.5 Soluzione di Formaldeide allo 0,1%

Composizione:

Formaldeide	13,5	mL
Acqua distillata	500	mL

Preparare al momento dell'uso con le dovute precauzioni e sotto cappa chimica e scartare dopo l'utilizzo.

2.6 Soluzione salina fosfatata con o senza Calcio e Magnesio (PBS)

In commercio esistono polveri premiscelate, con o senza calcio e magnesio, a basso costo. Sciogliere la polvere in acqua ultrapura secondo quanto riportato dalla casa produttrice e portare il pH a 7,2 ±0,2 con NaOH 0,1 M o HCl 0,1 M. Sterilizzare in autoclave per 15±1 minuti a 121±3°C. Prima dell'uso diluire 1:10 con acqua distillata sterile.

2.7 Soluzione fosfato di sodio bibasico anidro (Na_2HPO_4) allo 0,15 M pH 7,2

Composizione:

Fosfato di sodio bibasico anidro	2,4	g
Acqua ultrapura	100	mL

Sciogliere la soluzione utilizzando una barretta magnetica e sterilizzare in autoclave (121±3°C per 15±1 minuti). La soluzione, se conservata sterilmente in condizioni ottimali, può essere mantenuta per diversi mesi a temperatura ambiente.

2.8 Soluzione di polietilenglicol 6000 (PEG) al 50% (p/v)

Composizione:

Soluzione salina fosfatata senza calcio e magnesio (2.6)	90	mL
Cloruro di sodio (NaCl)	12	g
PEG 6000	80	g

Portare a 160 mL di volume totale con PBS senza calcio e magnesio.
Aggiungere un magnete alla soluzione di PEG al 50%. Sterilizzare in autoclave (15±1 minuti a 121±3°C). Una volta prelevata la soluzione dall'autoclave, mettere ad agitare per diverse ore (od anche per tutta la notte) finché la soluzione non diviene limpida. La soluzione, se conservata sterilmente in condizioni ottimali, può essere mantenuta per diversi mesi a temperatura ambiente.

2.9 Agar all'1,8%

Composizione:

Agar per colture cellulari	1,8	g
Acqua ultrapura	100	mL

Sterilizzare in autoclave (121±3°C per 15±1 minuti). Può essere conservato a circa +4°C per non oltre 6 mesi in condizioni ottimali. Se l'agar è troppo vecchio si può notare una certa difficoltà a solidificare.

2.10 Soluzione di Rosso neutro all'1%

Composizione:

Rosso neutro	1	g
Cloruro di sodio	8,5	g
Acqua ultrapura	100	mL

Sciogliere la soluzione utilizzando una barretta magnetica e sterilizzare in autoclave (121±3°C per 15±1 minuti). Distribuire sterilmente in aliquote. Può essere conservato a temperatura ambiente per non più di 6 mesi. Non agitare mai prima dell'uso al fine di evitare la risospensione di eventuali cristalli di colore che potrebbero interferire con la lettura.

2.11 "Pool" di antibiotici

Composizione:

Kanamicina	0,5	g
Streptomicina	6	g
Penicillina	5 milioni	di Unità
Micostatin	160.000	di Unità
Acqua ultrapura	50	mL

La composizione che viene indicata è una miscela ricca che può essere variata secondo le necessità, ad esempio aggiungendo antimicoplasmi in caso di presunta o accertata contaminazione delle linee cellulari.
Agitare la miscela con barretta magnetica per diverse ore e sterilizzare per filtrazione a pressione positiva. Distribuire la miscela in aliquote di 3-5 mL, congelare a circa -20°C ed utilizzare non oltre i 6 mesi.

2.12 Terreni per colture cellulari

I terreni per colture cellulari variano notevolmente per qualità, composizione di base ed aggiunta di fattori nutritivi per determinate linee cellulari, ad esempio amminoacidi non essenziali. Si rimanda pertanto agli appositi manuali. L'allestimento, la preparazione ed il mantenimento delle linee cellulari è un processo complesso che richiede un necessario periodo di addestramento in laboratori specializzati.

3. Strumentazione e vetreria di base

Oltre alla normale attrezzatura di base di laboratorio sono necessari:

- apparecchi per la produzione di acqua ultrapura;
- apparecchio per la produzione di acqua ultrapura per colture cellulari;
- bagnomaria;
- cappe a flusso laminare tipo "biohazard";
- centrifughe refrigerate a 6.000 rpm e 20.000 rpm;
- congelatori –20°C e –80°C;
- contenitori per azoto liquido;
- microscopio rovesciato;
- sistema di filtrazione per membrane piane di diverso diametro e relativa pompa da vuoto;
- sistema di ultrafiltrazione;
- termostati.

4. Procedura di campionamento

Nel caso di volumi limitati (pochi litri), il campione può essere raccolto in taniche sterili, trasportato in laboratorio nel più breve tempo possibile e in condizioni refrigerate. Il campione deve essere concentrato al suo arrivo in laboratorio o conservato a circa +4°C sino al momento dell'esame (massimo 24 ore). Nel caso di volumi troppo grandi, non adatti al trasporto in laboratorio, si può provvedere ad una concentrazione preliminare direttamente su campo e trasportare in laboratorio, in condizioni refrigerate, la membrana o cartuccia utilizzata. La presenza di cloro nelle acque non costituisce un problema nell'analisi virologica per la maggiore resistenza dei virus all'inattivazione sia nei confronti dei disinfettanti naturali sia artificiali. In considerazione dei volumi, spesso elevati, da analizzare, è necessario, eventualmente, per neutralizzare il cloro, utilizzare sistemi ad iniezione estremamente complessi e costosi. Nei casi in cui i volumi siano maneggiabili, e dove la presenza di cloro è accertata o sospetta, si può aggiungere sodio tiosolfato alla concentrazione di 50 mg/L di campione (2.1).
Nel caso di acque reflue o troppo torbide che potrebbero causare l'immediato intasamento delle membrane o cartucce è bene prefiltrare il campione attraverso alcuni strati di garza sterile.

5. Procedura di filtrazione del campione

In letteratura sono riportate numerose metodiche di concentrazione-eluizione del campione. Alcune sono state abbandonate nel corso degli anni perché troppo laboriose e di scarso recupero.
Nel complesso i metodi più comunemente usati sono:

- filtrazione su membrane piane o cartuccia a carica superficiale elettronegativa od elettropositiva;
- ultrafiltrazione con membrane o cartucce a porosità nota. In commercio esistono diversi tipi e modelli con porosità nominale da 1.000 a 1.000.000 daltons.

I metodi riportati di seguito sono frutto delle informazioni presenti in letteratura e sperimentati sia su campo sia in laboratorio. I metodi possono essere modificati ed adattati alle specifiche esigenze, ma nel caso devono essere adeguatamente valutati in prove sperimentali di laboratorio utilizzando virus a titolo noto. Lo stesso eluente utilizzato per favorire il distacco del virus dal supporto solido può essere variato secondo le proprie necessità (ad esempio, eluenti con pH troppo elevato possono inattivare i virus eventualmente presenti; soluzioni proteiche sono preferibili in caso di precipitazione acida o con PEG 6000).

6. Procedura di concentrazione primaria

Per questa fase possono essere utilizzati diversi sistemi ma le membrane elettronegative, così come le cartucce, che prevedono aggiunta di sali e acidificazione del campione mediante sistemi ad iniezione, non sono facilmente applicabili su campo. Tali membrane prevedevano l'acidificazione del campione a pH 3,5÷4,0 e l'aggiunta di cloruro di alluminio o cloruro di magnesio a differenti concentrazioni, determinando recuperi estremamente variabili a causa della obbligata manipolazione del campione stesso. Recentemente sono state prodotte membrane piane e cartucce a carica superficiale elettropositiva che operano in un campo di pH estremamente ampio, non necessitano di preacidificazione ed aggiunta di sali, e possono essere collegate ad una pompa per la filtrazione del campione direttamente su campo.
Montare la cartuccia e/o membrana a carica superficiale elettropositiva nell'apposito supporto e collegare direttamente il contenitore al rubinetto di prelievo o alla pompa.
Regolare il flusso d'acqua in uscita, in base alle indicazioni della casa produttrice le membrane e/o cartucce, applicando un regolatore del flusso idrico in entrata. In uscita è consi-

gliabile applicare un contalitri. Dopo il prelievo, mettere la cartuccia e/o membrana in una busta di plastica ed etichettarla indicando luogo, data del prelievo e il volume filtrato. Porre la cartuccia in una borsa termica o in frigorifero portatile sino al ritorno in laboratorio.
In laboratorio è preferibile eluire la cartuccia e/o membrana immediatamente o comunque entro le 24 h conservandola a circa +4°C.

6.1 Fase in laboratorio

Al fine di ridurre il volume da seminare su colture cellulari, che deve essere estremamente ridotto, è necessario procedere ad una seconda fase di concentrazione che può differenziarsi secondo i virus che si intendono ricercare o dell'eluente utilizzato per eluire la cartuccia e/o membrana.

6.2 Eluizione del virus adsorbito alla cartuccia e/o membrana

Per eluire correttamente una cartuccia da 10 pollici sono necessari 1,2-1,5 L di eluente (2.2b) in ricircolo continuo con l'ausilio di una pompa da laboratorio.
In breve: collegare l'uscita della pompa all'entrata del contenitore per cartucce. Il tubo di entrata della pompa deve pescare nella beuta contenente l'eluente. A sua volta l'uscita del contenitore deve ritornare, mediante un tubo flessibile, alla beuta.
Far fluire l'eluente per almeno 15 minuti e alla fine raccoglierlo svuotando completamente la cartuccia.
Nel caso di membrane piane da 142 mm utilizzare 90 mL di eluente facendolo passare lentamente goccia a goccia.
Neutralizzare l'eluato con acido cloridrico (HCl) (2.4) prestando attenzione che il pH sia intorno a 7,0±0,2. L'acidificazione eccessiva dell'eluato, specie nel caso contenga estratto di carne, determinerebbe una precipitazione delle proteine ed un'inattivazione dei virus eventualmente presenti.

7. Procedura di concentrazione secondaria

La stessa metodica descritta nella prima fase di concentrazione (cartuccia o membrana elettropositiva) può essere anche utilizzata nella seconda fase, utilizzando membrane o cartucce di superficie inferiore. Altri sistemi prevedono una precipitazione degli enterovirus eventualmente presenti: la flocculazione organica (nel caso di soluzioni di natura proteica), l'ultracentrifugazione, o la precipitazione con diversi agenti chimici quali il solfato di alluminio, il cloruro di alluminio o di ferro, l'idrossido di magnesio e il Polietilenglicol 6000. Verranno descritte le tre metodiche più comunemente utilizzate: l'ultrafiltrazione, la flocculazione organica e la precipitazione con Polietilenglicol 6000.

7.1 Ultrafiltrazione a flusso tangenziale

L'ultrafiltrazione è un processo di separazione delle particelle in funzione del solo peso molecolare. Esistono diverse membrane con tagli molecolari ("nominal molecular weight limit") da 1.000 dalton sino a 1.000.000 di dalton. La funzione delle membrane è quella di porre una barriera tra le sostanze che riescono ad attraversare le membrane e le altre, a peso molecolare più elevato rispetto al taglio molecolare ("cut-off"), che sono trattenute, ad esempio i virus. Nel caso specifico gli enterovirus vengono concentrati non per adsorbimento su membrane ma per riduzione progressiva del volume del campione dovuto a perdita di acqua, sali e soluti in base al "cut-off" scelto. Le membrane attualmente in commercio sono di due tipi: cellulosa rigenerata e polisulfone, e possono essere a cartuccia (membrana avvolta a spirale) o a membrana piana.
Si consiglia l'uso di membrane con taglio molecolare pari a 100.000 dalton. Nel caso di acque torbide è assolutamente indispensabile prefiltrare il campione attraverso diversi strati di garza sterile al fine di eliminare il particolato più grossolano, o utilizzando appositi prefiltri

a basso adsorbimento proteico. L'ultrafiltrazione può essere utilizzata sia come metodo di concentrazione primaria che secondaria.

7.1.1 Preparazione del campione

Il campione non necessita di pretrattamenti sebbene, per migliorare il rendimento della membrana e/o cartuccia (recupero), è preferibile pretrattarla con estratto di carne al 3%, pH 7,2±0,2 (2.2a) prevenendo così l'adsorbimento aspecifico dei virus.

7.1.2 Concentrazione

- montare la membrana e/o cartuccia secondo le istruzioni della casa produttrice;
- lavare la membrana e/o cartuccia con 5-10 L di acqua distillata al fine di allontanare il liquido conservante, in genere formaldeide allo 0,1% (2.5);
- pretrattare il sistema con estratto di carne a pH 7,2±0,2 (2.2a) facendolo ricircolare per 5 minuti;
- far circolare il campione alle seguenti condizioni operative: 10-12 psi in entrata; rapporto ritenuto/filtrato (ultraconcentrato/scarto) 1:5÷7;
- fermare l'apparecchio quando il recipiente del campione è quasi vuoto. In questo caso il volume del campione è rappresentato dal solo volume di riempimento dei tubi e di imbibizione della membrana e/o cartuccia. Svuotare il sistema completamente e raccogliere il campione;
- lavare la membrana e/o cartuccia con una soluzione di estratto di carne al 3% pH 9,5±0,2 (2.2b), utilizzando un volume pari a 3/4 dell'ultraconcentrato;
- Riunire l'ultraconcentrato con la soluzione di lavaggio;
- neutralizzare il pH del campione-concentrato finale;

Il campione può essere ulteriormente concentrato se necessario, utilizzando sistemi di ultrafiltrazione in grado di trattare volumi minori di acqua, oppure mediante flocculazione organica o mediante precipitazione con Polietilenglicol 6000.

A fine campionamento:

- lavare la membrana con 1-2 L di acqua distillata;
- far circolare in continuo per almeno 15 minuti una soluzione di NaOH allo 0,1 M (2.3);
- lavare la membrana con 2-3 L di acqua distillata.

A questo punto la membrana può essere utilizzata per un nuovo campione o conservata per successive analisi, facendo circolare in continuo una soluzione di formaldeide allo 0,1% (2.5) per almeno 5-10 minuti.
Spegnere la pompa ed estrarre la membrana cercando di conservare quanta più formaldeide possibile all'interno della membrana, al fine di evitare l'essiccamento della stessa. Riporre in idoneo contenitore aggiungendo formaldeide come liquido conservante.

7.2 Flocculazione organica

Questa tecnica si basa sulle capacità delle proteine di precipitare a pH acidi e comunque inferiori al loro punto isoelettrico. I virus presenti nel campione sono imprigionati nei flocculati e raccolti per semplice centrifugazione.
Questa metodica è applicabile solo a soluzioni proteiche o comunque rese tali per semplice aggiunta di estratto di carne. La flocculazione organica va attentamente controllata per impedire una caduta eccessiva del pH che potrebbe inattivare i virus presenti (esempio Rotavirus). Esistono in commercio estratti di carne purificati che migliorano il rendimento della flocculazione organica.

7.2.1 Concentrazione

La soluzione proteica è portata lentamente a pH 3,5±0,2 e mantenuta costantemente in agitazione lenta per 30 minuti. Il flocculato è recuperato per semplice centrifugazione a 3500 g per 30 minuti a circa +4°C. Il "pellet" è risospeso in una soluzione sterile di Na_2HPO_4 0,15 M pH 7,2 (2.7). Dopo dissoluzione del "pellet", il pH è riportato a 7,2±0,2 con l'aggiunta di idrossido di sodio (2.3).

7.3 Precipitazione con Polietilenglicol 6000 (PEG)

Il PEG è un polimero sintetico solubile in acqua ed atossico su colture cellulari. Il PEG determina una polimerizzazione delle molecole di acqua intorno alle proteine, e quindi ai virus, causandone una precipitazione. Può essere utilizzato sia con soluzioni proteiche che saline.

7.3.1 Concentrazione

Il campione, addizionato con PEG (2.8) in rapporto di 1:4 (v/v) (concentrazione finale 10%), é posto a circa +4°C, in agitazione lenta per una notte.
Il precipitato, spesso invisibile, raccolto per centrifugazione a 10.000 g per 45 minuti a circa +4°C, è risospeso nel minor volume possibile (2-3 mL) di fosfato disodico (2.7) sterile, pH 7,2±0,2.
I tempi di centrifugazione sono proporzionali ai volumi da centrifugare, in genere per volumi da 50 a 100 mL sono necessari 45-60 minuti. Per volumi superiori (200-250 mL) si può arrivare anche alle 2 h di centrifugazione.
La precipitazione con PEG, che richiede l'utilizzo di una centrifuga ad alta velocità, è un processo meno drastico rispetto alla flocculazione organica.

8. Isolamento ed identificazione di enterovirus

I virus umani sono parassiti strettamente endocellulari. Necessitano quindi di cellule in cui moltiplicarsi. Alcuni virus, come i Poliovirus, possono moltiplicarsi su diverse linee cellulari, mentre altri virus presentano una specificità cellulare più stretta. Un terzo gruppo di enterovirus comprende virus che non sono in grado di moltiplicarsi in alcuna delle linee cellulari attualmente utilizzate. Essi sono evidenziabili con sistemi diversi. Alcuni virus, capaci di moltiplicarsi su sistemi cellulari, sono in grado di indurre un tipico effetto citopatico (Poliovirus, Echovirus, Coxsackievirus), altri (Epatite A, Rotavirus) possono moltiplicarsi senza indurre alcuna alterazione evidente. In quest'ultimo caso la loro presenza può essere svelata solo con tecniche immunologiche (immunofluorescenza diretta o indiretta, "test" immunoenzimatici, "test" radioimmunologici) o di biologia molecolare (ibridazione, reazione a catena della polimerasi). Molti di questi "test" sono già commercializzati ma, in alcuni casi, richiedono una certa esperienza da parte dell'operatore. Tutti i test immunologici si basano sull'utilizzo di un anticorpo marcato con radioattivo, fluoresceina o con un enzima. Altri "test" immunoenzimatici, come ad esempio, il test di immunomicroscopia elettronica, difficilmente possono essere applicabili all'ambiente in quanto la bassa sensibilità del "test" richiede un'elevata concentrazione virale, necessaria per una risposta positiva, difficilmente raggiungibile in campioni ambientali.

9. Colture cellulari

È buona norma, che tutti i laboratori di virologia ambientale, abbiano a disposizione più di una linea cellulare secondo il virus che si intende ricercare. Le linee cellulari sono classificabili in tre gruppi: cellule di primo espianto, linee cellulari continue (le più utilizzate) e cellule diploidi. Le modalità di coltivazione, di subcoltivazione, di congelamento in azoto liquido per il mantenimento a lungo termine delle linee cellulari è estremamente complesso. Pertanto, pri-

ma di adottare tecniche di coltivazione e mantenimento di cellule per l'isolamento di virus da campioni ambientali, è consigliabile svolgere un periodo di addestramento in laboratori specializzati.
Le cellule vengono fatte crescere su supporti solidi (fiasche) in plastica speciale per colture cellulari di dimensioni variabili da 12,5 cm^2 sino a 175 cm^2, o in "roller" (fiasche tonde in rotazione continua) da 500 cm^2. Le cellule possono essere anche coltivate in tubi, in piastre da 2 a 96 pozzetti od in capsule di Petri in genere da 45 a 90 mm di diametro.
I monostrati cellulari ad intervalli regolari e variabili, secondo le diverse linee cellulari, devono essere separati nelle loro singole cellule da utilizzare per la preparazione di altri monostrati cellulari.
I campioni comunque concentrati presentano una notevole quantità di batteri che debbono essere eliminati prima dell'inoculo su cellule. Inoculare 0,5 mL di campione per fiasche da 25 cm^2 ed aggiungere uguale volume di terreno di mantenimento (diluizione finale1:2). La quantità di campione che può essere inoculato su monostrati cellulari dipende strettamente dalla tossicità del campione ed in alcuni casi è consigliabile ricorrere a diluizioni superiori (1:7-1:10).
L'isolamento su monostrato cellulare può essere effettuato, dopo inoculo del campione sul monostrato cellulare e successivo adsorbimento del virus, aggiungendo terreno per colture cellulari in soluzione liquida o addizionato ad agar.

9.1 Decontaminazione per filtrazione

Esistono in commercio filtri già pre-assemblati ed a basso adsorbimento proteico. Il diametro del filtro può variare in base alla torbidità ed al volume del campione:

- Pretrattare il filtro, utilizzando una siringa sterile, da 0,22 μm e di 12 mm di diametro con 4-5 mL di estratto di carne (2.2a) a pH 7,2 ±0,2 o con terreno per colture cellulari (2.12) al fine di prevenire l'adsorbimento aspecifico dei virus.
- Filtrare il campione e raccoglierlo in un contenitore sterile.
- Aggiungere antibiotici (2.11) in rapporto 1:50 ed incubare per 2 h a 36±1°C.

9.2 Decontaminazione con cloroformio

- Aggiungere al campione cloroformio a concentrazione finale pari al 30%.
- Agitare vigorosamente per 15-20 minuti.
- Centrifugare a 3500 rpm per 15 minuti a temperatura ambiente.
- Prelevare accuratamente e sterilmente la fase acquosa.
- Aggiungere alla fase acquosa un "pool" di antibiotici (2.11), in rapporto 1:50.
- Mettere il campione per 2 h a 36±1°C.

9.3 Inoculo su monostrati con terreno liquido

- Preparare monostrati cellulari in fiaschette da 25 cm^2 o superiori.
- Eliminare il terreno di crescita. Inoculare il campione precedentemente trattato. Lasciare a contatto il campione (adsorbimento) per 1-2 h a 36±1°C in agitazione lenta ma continua utilizzando un agitatore basculante. Osservare al microscopio invertito l'eventuale effetto tossico del campione (distruzione del monostrato non imputabile a virus). In caso di elevata tossicità, ripetere l'inoculo del campione su nuovo monostrato cellulare a diluizione maggiore.

In caso di assenza di tossicità, eliminare l'inoculo e lavare il monostrato cellulare con terreno per colture cellulari (2.12) o soluzione salina sterile completa di calcio e magnesio (2.6).
Aggiungere 6-7 mL di terreno per colture cellulari (2.12) per fiasche da 25 cm^2. Incubare a 36±1°C ed osservare le cellule giornalmente al fine di evidenziare un effetto citopatico da virus.
Dopo una notte di incubazione si può presentare un effetto tossico ritardato, seppur minimo.
È necessario affiancare alle analisi in corso, almeno 2 fiaschette di cellule non infettate e trattate allo stesso modo delle cellule infette (controllo).

Le colture debbono essere osservate per almeno 2 settimane. L'effetto citopatico da virus deve essere confermato con un secondo passaggio inoculando un'aliquota del lisato cellulare del primo passaggio (previo congelamento e scongelamento per almeno tre volte) su un nuovo monostrato cellulare.

9.4 Inoculo su monostrati mantenuti in terreni agarizzati

Questa tecnica può essere applicata solo per la ricerca di virus che provocano placche di lisi ben visibili.

9.4.1 Metodo delle placche in presenza di colorante vitale

Preparare monostrati cellulari su capsule di Petri da 100 mm di diametro. Trattare il campione ed inoculare come sopra descritto (9.3) incubando le capsule di Petri in atmosfera di 5% di CO_2. Eliminare l'inoculo e lavare il tappeto di cellule con soluzione salina sterile completa di calcio e magnesio (2.6). Aggiungere 10 mL di terreno per colture cellulari doppio concentrato (2.12) addizionato con agar (2.9) (50%-50%). Dopo solidificazione aggiungere un secondo strato di terreno per colture cellulari doppio concentrato agarizzato contenente rosso neutro allo 0,1% (2.10).
Dopo solidificazione del secondo strato, incubare le piastre a 36±1°C in atmosfera di 5% di CO_2.
Il colorante vitale determina una colorazione rosso pallido del monostrato integro, mentre le placche di lisi sono visibile come foci rotondi non colorati. La giusta concentrazione di rosso neutro presente nel secondo strato deve essere determinata e valutata a seconda delle personali esigenze.

10. Isolamento di virus che non provocano effetto citopatico: sistemi immunologici

Alcuni virus possono moltiplicarsi senza indurre un'alterazione visibile del tappeto cellulare (Rotavirus), altri virus crescono con estrema difficoltà e con tempi di incubazione lunghi anche diverse settimane (Epatite A). Questi virus possono essere messi in evidenza con tecniche immunologiche di immunofluorescenza diretta o indiretta, "radio-immuno focus assay" (RIFA) (richiede la marcatura radioattiva dell'anticorpo) e tecniche immunoenzimatiche (ELISA) dove l'anticorpo specifico verso un determinato antigene è adeso alla fase solida (piastre per "test" ELISA a 96 pozzetti).
Ogni "test" deve sempre comprendere controlli negativi (cellule non infettate) e controlli positivi (cellule infettate con ceppi virali noti di laboratorio).

11. Tecniche di biologia molecolare

Possono essere applicate sia al campione concentrato (senza passaggio su monostrati cellulari) sia dopo passaggio su cellule.
Negli anni più recenti accanto ai tradizionali "test" si sono sviluppati metodi di analisi biologico-molecolare. Tali sistemi comprendono le sonde molecolari o "probes" sia a DNA sia a RNA ("test" di ibridazione) e più recentemente la reazione a catena della polimerasi ("Polymerase Chain Reaction", PCR). Tali tecniche hanno ricevuto un notevole sviluppo, sebbene entrambe non siano in grado di discriminare tra particelle virali infettive e no.
Le sonde molecolari sono costituite da RNA o DNA complementare ad una sequenza specifica ed unica del genoma virale. Tali sonde, come nel caso degli anticorpi, sono marcate con enzimi o con isotopi radioattivi. L'uso delle sonde molecolari per la ricerca degli enterovirus ha avuto il merito di avere introdotto tecniche di biologia molecolare nel campo ambientale, ma presenta un unico limite legato alla loro sensibilità che le rende applicabili solo ad acque con alto titolo virale (limite di sensibilità: 10^3 particelle virali infettive).
Il "test" di reazione a catena della polimerasi (PCR) consiste in un'amplificazione selettiva di

una porzione unica e specifica del genoma secondo una relazione del tipo 2^n, con n uguale al numero di cicli di amplificazione. Alla fine del "test" la sequenza è stata copiata da appositi enzimi fino ad un massimo di 10^6 copie. L'amplificato può essere successivamente risolto ed identificato sia su gel di agarosio, in quanto essendo nota la sequenza se ne conosce anche dimensione e peso molecolare, sia mediante "test" di ibridazione molecolare su supporto solido utilizzando apposite sonde marcate ("test" di ibridazione). Il limite di sensibilità del test è compreso tra 3-30 particelle virali infettive, sebbene, in teoria, anche una singola particella virale può essere rivelata con il "test" di reazione a catena della polimerasi. Sebbene tale "test" è oramai largamente accettato esistono, anche in questo caso, diversi problemi legati soprattutto alla presenza di inibitori aspecifici e non delle reazioni enzimatiche. Diverse procedure sono state adottate al fine di eliminare tali inibitori da campioni ambientali; è bene comunque considerare che ogni tecnica deve essere sempre attentamente valutata in laboratorio ed adattata alle personali esigenze.

BIBLIOGRAFIA

DIVIZIA M. (1996): "Il destino dei virus enterici nei fanghi di risulta degli impianti di depurazione: aspetti metodologici ed epidemiologici", Rapporti ISTISAN 95/38.

DIVIZIA M., DONIA D., GABRIELI R., RUSCIO V. & PANÀ A. (1997): "Valutazioni relative ad un nuovo sistema di ultrafiltrazione per la concentrazione di enterovirus e batteriofagi", *Igiene e Sanità Pubblica*, vol. LIII n. 5, 315-323.

DIVIZIA M., GABRIELI R., DONIA D., PANÀ A., OTTAVIANI M., BONADONNA L., MANCINI L., GASBARRO G., LULLI G. & ZANOBINI A. (1994): "Environmental impact od sewage sludge: possibility and limits for agricultural use", *Nuovi Annali di Igiene e Microbiologia*, **6**, 941-944.

DIVIZIA M., PALOMBI L., BUONOMO E., DONIA D., RUSCIO V., EQUESTRE M., LENO L., PANÀ A. & DEGENER A.M. (1999): "Genomic characterization of human and environmental poliovirus isolated in Albania, *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**, (8).

DIVIZIA M., RUSCIO V., DEGENER A.M. & PANÀ A. (1998): "Hepatitis A virus detection in wastewater by PCR and hybridization", *Microbiologica*, **21**, 161-167.

GABRIELI R., DIVIZIA M., DONIA D., RUSCIO V., BONADONNA L., DIOTALLEVI C., VILLA L., MANZONE G. & PANÀ A. (1997): "Evaluation of the wastewater treatment plant of Rome airport, *Wat. Sci. Technol.*, **35** (11), 193-196.

KADER O.A., DIVIZIA M., GHAZZAWI E. El, GAMIL F., RENGANATHAN E. & PANÀ A. (1994): "Poliovirus detection in environmental samples by cell cultures and hybridization test", *Nuovi Annali di Igiene e Microbiologia*, **6**, 935-938.

7130. Oocisti di *Cryptosporidium* e cisti di *Giardia*

1. Introduzione

1.1 Generalità

Il protozoo coccide *Cryptosporidium parvum* ed il protozoo flagellato *Giardia lamblia* sono agenti eziologici di forme acute di gastroenterite nell'uomo. Entrambe le infezioni sono trasmesse per via fecale-orale attraverso l'ingestione di oocisti di *Cryptosporidium* e di cisti di *Giardia*. Infezioni da *Cryptosporidium* e da *Giardia* sono ampiamente segnalate con una prevalenza nei paesi industrializzati dell'1-3% per il primo e del 2-5% per il secondo e, nei paesi in via di sviluppo, del 5-10% per *Cryptosporidium* e del 20-30% per *Giardia*. I dati più recenti hanno dimostrato che le oocisti e le cisti possono essere ritrovate in acque superficiali e profonde, in acque potabili marine e reflue. L'acqua è stata pertanto riconosciuta tra i principali veicoli di infezione. La scarsa specificità d'ospite favorisce la diffusione dei parassiti nell'ambiente, come anche l'elevato numero di cisti ed oocisti emesse dagli animali infetti e la loro straordinaria resistenza alla disinfezione ed alle condizioni ambientali. Le acque superficiali possono essere contaminate sia direttamente dall'apporto di feci emesse da animali infetti, sia attraverso acque di dilavamento di suoli adibiti al pascolo di animali infetti, acque di scarico e percolati. Nelle acque superficiali il valore di concentrazione di oocisti di *Cryptosporidium* e di cisti di *Giardia* può variare da 0 a 10^2/L.
In considerazione della potenziale diffusione nell'ambiente dei due parassiti e del ruolo che essi possono assumere in relazione alla salute umana, si pone la necessità di definire metodi idonei alla loro ricerca nelle acque anche in funzione della loro capacità di resistenza ai trattamenti di disinfezione.

1.2 Obiettivo

I metodi consentono di valutare la concentrazione di oocisti di *Cryptosporidium* e di cisti di *Giardia* in un volume noto di acqua.

2. Metodo 1

2.1 Principio del metodo

Volumi noti del campione da analizzare sono filtrati attraverso un filtro a capsula; si procede quindi all'eluizione delle cisti ed oocisti dal filtro e alla concentrazione e purificazione dell'eluato tramite centrifugazione e flottazione. Infine, mediante immunofluorescenza diretta, si procede alla determinazione e al conteggio al microscopio.

2.2 Campo di applicazione

La procedura analitica viene utilizzata per acque superficiali, di fiume, di lago e per acque reflue anche sottoposte a trattamento. Non consente la determinazione dei parassiti a livello di specie né permette di valutarne l'infettività e la vitalità.

2.3 Possibili interferenze

Valori elevati di torbidità possono diminuire l'efficienza di recupero del metodo (20-35% per le oocisti di *Cryptosporidium* e 45-95% per le cisti di *Giardia,* prima della flottazione). Campioni particolarmente torbidi e con presenza di solidi sospesi possono intasare i pori del filtro e rendere più difficile la fase di filtrazione. Inoltre, durante la fase di identificazione al microscopio particelle di detriti eventualmente non eliminate durante i lavaggi possono nascondere la presenza di cisti ed oocisti.

3. Reattivi

3.1 Soluzione tamponata di Formaldeide al 10%

Composizione:

Na_2HPO_4	0,76	g
NaH_2PO_4	0,02	g
Acqua distillata	800	mL

Sciogliere i composti adottando le dovute precauzioni ed operando sotto cappa chimica aggiungendo 100 mL di Formaldeide e portando ad 1L con acqua distillata.

3.2 Soluzione di PBS (Phosphatase Buffer Saline) 10x

Composizione:

NaCl	80	g
KH_2PO_4	2	g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	29	g
KCl	2	g
Acqua distillata		

Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata. Aggiustare il pH a 7,2±0,2 con NaOH 0,1 M o HCl 0,1 M. Sterilizzare in autoclave per 15±1 minuti a 121±3°C.
La soluzione è anche disponibile in commercio pronta per l'uso.

3.3 Soluzione di Percoll-Saccarosio

Composizione:

Percoll (densità=1,13)	45	mL
Saccarosio 2,5 M	10	mL
Acqua distillata	45	mL

Mescolare i componenti e controllare che la densità sia tra 1,09-1,1 con un idrometro.
Nel corso della procedura mantenere i reattivi a circa +4°C.

3.4 Soluzione di Saccarosio 2,5 M

Composizione:

Saccarosio	855,8	g
Acqua distillata	400	mL

Preparare la soluzione sciogliendo il saccarosio in acqua distillata preriscaldata. Attendere che la soluzione si raffreddi, quindi portare a volume finale di 1 L con acqua distillata.

3.5 Tampone per eluizione

Composizione:

Laureth-12	1	g
Acqua distillata	100	mL

Preparare la soluzione sciogliendo il componente in acqua distillata in un beaker di vetro pirex. Scaldare su una piastra o in un forno a microonde per consentire al Laureth-12 di sciogliersi. La soluzione viene quindi trasferita in un matraccio da 1 L, il beaker sciacquato numerose volte con acqua distillata e i liquidi di risciacquo raccolti nel matraccio stesso. Aggiungere quindi i seguenti reattivi:

Tris 1 M, pH 7,4	10	mL
EDTA, 2Na 0,5 M, pH 8	2	mL
Antischiuma A	150	µL

Portare ad 1 L con acqua distillata.

3.6 Tris 1 M, pH 7,4

Composizione:

Tris	121,1	g
Acqua distillata	700	mL

Preparare la soluzione sciogliendo il componente in acqua distillata. Portare a pH 7,4±0,2 con HCl o NaOH 1 M. Portare a 1 L con acqua distillata. Sterilizzare con un filtro a membrana da 0,22 µm; conservare in un contenitore di plastica a temperatura ambiente.

3.7 EDTA, 2Na·2H_2O, 0,5 M, pH 8,0

Composizione:

acido Etilendiaminotetracetico disodico, diidrato (EDTA, 2Na·2H_2O)	186,1	g
Acqua distillata		

Sciogliere l'EDTA nell'acqua e portare a pH 8±0,2 con HCl o NaOH 0,1 M. Portare a 1 L con acqua distillata.

3.8 Soluzione di lavaggio A

Composizione:

Sodio Dodecil Solfato (SDS)	1	g
Acqua distillata	300	mL

Preparare la soluzione sciogliendo l'SDS in acqua distillata.
Aggiungere poi i seguenti componenti:

PBS 10x	100	mL
Tween-80	1	mL
Antischiuma A	500	µL

Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata.

3.9 Soluzione di lavaggio B

Composizione:		
Tween 20	0,5	mL
PBS 10 x	100	mL

Preparare la soluzione portando a volume finale di 1 L con acqua distillata.

3.10 "Kit" per la determinazione di oocisti e di cisti mediante immunofluorescenza diretta

I kit presenti in commercio sono composti da:

- anticorpi monoclonali diretti contro le oocisti di *Cryptosporidium* e le cisti di *Giardia* coniugati con Isotiocianato di Fluoresceina (FITC);
- controllo positivo;
- controllo negativo;
- tampone di lavaggio;
- soluzione di montaggio ("Mounting Medium").

4. Strumentazione e vetreria

Per lo svolgimento dell'analisi è necessario disporre di:

- agitatore con braccetti;
- apparato di filtrazione per filtri a membrana da 25 mm di diametro;
- camera umida;
- centrifuga refrigerata (intorno a +4°C) a rotore basculante per contenitori da 50-250 mL;
- contalitri;
- contenitori da centrifuga da 250 mL con fondo conico o tipo bottiglia;
- contenitori da centrifuga monouso da 50 e 15 mL con fondo conico;
- filtro a capsula in polietersulfone, (1 µm di porosità, 6 cm di diametro, 12 cm di lunghezza, 1300 cm^2 di superficie);
- incubatore settabile a 36±1 °C;
- membrane di policarbonato, 1,2 µm, 25 mm di diametro;
- microscopio ad epifluorescenza con filtri di eccitazione 450-490 nm, filtro barriera 515-520, obiettivi 20, 40 e 100x ed oculare con micrometro lineare. È necessario disporre del contrasto di fase e qualora possibile del contrasto ad interferenza differenziale (DIC) per l'obiettivo 100x;
- pipette da 1 mL, 10 mL e 25 mL;
- pipettatrice automatica;
- pompa peristaltica;
- regolatore di flusso;
- tubi semirigidi di connessione con relativi raccordi e fascette;
- vetrini a pozzetto (compresi nel "kit" per l'immunofluorescenza);
- "vortex".

5. Procedura

5.1 Campionamento e filtrazione

Questo metodo consente di campionare volumi variabili d'acqua (10-700 L) in relazione alla sua torbidità, usando eventualmente più cartucce per filtrare il volume appropriato.
La filtrazione deve avvenire con un flusso non superiore a 2 L/min.

5.2 Eluizione della capsula

Per l'eluizione di una capsula si utilizzano 240 mL di tampone per eluizione (3.5).
Con un cilindro graduato aggiungere 120 mL di tampone per eluizione attraverso l'estremità di entrata della capsula. La capsula viene quindi posta nello "shaker" in modo che la valvola di sfiato posta sulla sua estremità di ingresso sia posizionata a ore 12. Si procede all'agitazione per 5 minuti a 600 rpm. L'eluato viene raccolto in un tubo da centrifuga.
Aggiungere gli altri 120 mL di tampone per eluizione nella capsula e procedere ad una seconda agitazione per 5 minuti a 600 rpm, posizionando il lato di ingresso della capsula in modo tale che la valvola di sfiato sia ad ore 9. Aggiungere l'eluato ottenuto al precedente nel tubo da centrifuga. Centrifugare a 1100 x g per 10 minuti e decelerare lentamente senza usare il freno. Eliminare il supernatante con l'accortezza di non disturbare il "pellet". Misurare il volume del campione concentrato (1-10 mL).
La procedura può essere interrotta in questa fase aggiungendo al campione un uguale volume di soluzione tamponata di formaldeide al 10% (3.1).
Si può procedere direttamente all'analisi del campione per immunofluorescenza o, nel caso l'eccessiva torbidità del campione non lo consentisse, chiarificare il campione per flottazione.

5.3 Chiarificazione per flottazione

A 19,5 mL di soluzione di lavaggio A (3.8) si aggiungono 0,5 mL di campione concentrato, utilizzando una provetta da 50 mL. Miscelare ed iniettare, con una siringa provvista di cannula, 30 mL di soluzione di Percoll-Saccarosio (3.3) al di sotto della sospensione, con l'accortezza di non arrecare danno all'interfaccia tra le due soluzioni. Centrifugare a 1050 x g per 10 minuti a circa +4°C accelerando lentamente e senza usare il freno alla fine della centrifugazione.
Prelevare il supernatante, l'interfaccia e circa 5 mL di Percoll-Saccarosio e raccoglierlo in una provetta da 50 mL. Portare a 50 mL con la soluzione di lavaggio B (3.9) mescolare con vortex e centrifugare a 1050 x g per 15 minuti. Scartare il supernatante fino ad ottenere un "pellet" di 1-5 mL.

5.4 Determinazione mediante immunofluorescenza diretta

Si usano anticorpi monoclonali anti-cisti di *Giardia* e anti-oocisti di *Cryptosporidium* coniugati con FITC (3.10) che si legano ad antigeni presenti sulle pareti.
Se l'analisi viene effettuata su vetrino a pozzetto, si trasferiscono 10-30 µL di campione in un pozzetto, 10 µL di controllo positivo in un altro pozzetto e 10 µL di controllo negativo in un altro ancora; si lascia asciugare a temperatura ambiente o più rapidamente in stufa a circa 36°C. Fissare ciascun campione secondo le modalità indicate dalla ditta produttrice del "kit". Mettere 20-50 µL del reagente contenente anticorpi fluoresceinati su ciascun pozzetto ed incubare il vetrino in camera umida, al buio, a temperatura ambiente per 30 minuti. Lavare delicatamente il vetrino con PBS 1x o con tampone di lavaggio e far asciugare all'aria. Porre una goccia di soluzione di montaggio su ciascun pozzetto e farvi aderire un vetrino coprioggetto, facendo attenzione a non formare bolle.
Se l'immunofluorescenza viene condotta su filtro, porre la membrana (porosità 1,2 µm, in policarbonato, di diametro 25 mm), sul supporto di filtrazione, bagnarla con PBS 1x e filtrare 1 mL di campione. Aggiungere una goccia del reagente contenente anticorpi fluoresceinati. Incubare per 30 minuti a temperatura ambiente al buio. Filtrare, quindi lavare per tre volte la membrana aggiungendo 3 mL di PBS 1 x o di tampone di lavaggio e filtrando di volta in volta. Eliminare ogni traccia di liquido mediante filtrazione. Porre una goccia di liquido di montaggio su un vetrino, farvi aderire la membrana, e montare su questa il vetrino coprioggetto con il liquido di montaggio.

5.5 Esame microscopico

Osservare l'intera superficie di ogni pozzetto a 200 o 400 ingrandimenti con il microscopio

ad epifluorescenza ed individuare le strutture fluorescenti verde mela con forma e dimensioni caratteristiche delle cisti di *Giardia* (lunghezza 8-12 µm e larghezza 7-10 µm) e oocisti di *Cryptosporidium* (3,5-6,5 µm). Segnare le coordinate del vetrino dove sono state rinvenute le cisti e le oocisti ed effettuare l'osservazione delle stesse strutture in epifluorescenza a 1000 ingrandimenti in immersione, quindi passare sull'obiettivo con il contrasto di fase o con il contrasto ad interferenza differenziale (DIC). L'osservazione a contrasto di fase consente di distinguere le cisti ed oocisti piene da quelle vuote fornendo in tal modo indicazioni sulla presunta vitalità delle cisti ed oocisti piene. L'osservazione a contrasto interferenziale permette invece di valutare la presenza di strutture interne (nuclei, corpi mediani, spazio peritrofico nella *Giardia*; sporozoiti e granuli residui nel *Cryptosporidium*), fornendo sia una ulteriore conferma alla determinazione, sia l'opportunità di distinguere tra cisti ed oocisti vuote, contenenti strutture amorfe oppure contenenti strutture caratteristiche ben conservate.
Annotare il numero totale di cisti di *Giardia* e di oocisti di *Cryptosporidium* ed eventualmente quelle che si presentano piene o vuote e con o senza strutture interne.

5.6 Interpretazione dei risultati

La presenza di strutture conformi per fluorescenza, forma e dimensioni a cisti di *Giardia e* oocisti di *Cryptosporidium* permette di considerare il campione presuntivamente positivo.
Alcuni organismi (alghe e lieviti) e detriti autofluorescenti alla stessa lunghezza d'onda del FITC possono essere registrati come falsi positivi ed interferire nei risultati dell'analisi.
L'impiego di disinfettanti può dar luogo ad interferenze nella individuazione delle strutture interne alle cisti ed oocisti perché può causarne la parziale distruzione o trasformazione in strutture amorfe difficilmente riconoscibili.

6. Espressione dei risultati

Il numero di cisti ed oocisti contate sull'intera superficie di ciascun pozzetto si riferisce al volume di campione ivi deposto; tale numero viene quindi rapportato al volume di "pellet" chiarificato (0,5 mL) e moltiplicato per il volume dell'eluato (1-10 mL). Il risultato viene infine rapportato al numero di litri di campione filtrati.

7. Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero di microrganismi per volume di campione.
Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

8. Metodo 2

8.1 Principio del metodo

Prevede la filtrazione di campioni di acqua su membrana di porosità nominale di 0,12 µm, la dissoluzione della membrana, la concentrazione dell'emulsione mediante centrifugazione, il lavaggio del "pellet" con solventi, la determinazione e la conta al microscopio delle cisti ed oocisti mediante immunofluorescenza diretta.

8.2 Campo di applicazione

La procedura analitica viene utilizzata per acque superficiali, di fiume, di lago e per acque reflue anche sottoposte a trattamento. Non consente la determinazione dei parassiti a livello di specie né permette di valutarne l'infettività e la vitalità.

8.3 Possibili interferenze

Valori elevati di torbidità possono diminuire l'efficienza di recupero del metodo (25-40% per le oocisti di *Cryptosporidium* e 50-60% per le cisti di *Giardia,* prima della flottazione). Campioni particolarmente torbidi e con presenza di solidi sospesi possono intasare i pori del filtro e rendere più difficile la fase di filtrazione. Inoltre, durante la fase di identificazione al microscopio particelle di detriti eventualmente non eliminate durante i lavaggi possono nascondere la presenza di cisti ed oocisti.

9. Reattivi

9.1 Acetone

9.2 Etanolo

9.3 Etanolo al 70%

Aggiungere a 700 mL di Etanolo 300 mL di acqua distillata e mescolare i due componenti.

9.4 Soluzione tamponata di Formaldeide al 10%

Composizione:

Na_2HPO_4	0,76	g
NaH_2PO_4	0,02	g
Acqua distillata	800	mL

Sciogliere i composti adottando le dovute precauzioni ed operando sotto cappa chimica aggiungendo 100 mL di Formaldeide e portando ad 1L con acqua distillata.

9.5 Soluzione di PBS (Phosphatase Buffer Saline) 10x

Composizione:

NaCl	80	g
KH_2PO_4	2	g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$	29	g
KCl	2	g
Acqua distillata		

Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata. Aggiustare il pH a 7,2±0,2 con NaOH 0,1 M o HCl 0,1 M. Sterilizzare in autoclave per 15±1 minuti a 121±3°C.
La soluzione è anche disponibile in commercio pronta per l'uso.

9.6 Soluzione di Percoll-Saccarosio

Composizione:

Percoll (densità=1,13)	45	mL
Saccarosio 2,5 M	10	mL
Acqua distillata	45	mL

Mescolare i componenti e controllare che la densità sia tra 1,09-1,1 con un idrometro.
Nel corso della procedura mantenere i reattivi a circa +4°C.

9.7 Soluzione di Saccarosio 2,5 M

Composizione:

Saccarosio	855,8	g
Acqua distillata	400	mL

Preparare la soluzione sciogliendo il saccarosio in acqua distillata preriscaldata. Attendere che la soluzione si raffreddi, quindi portare a volume finale di 1 L con acqua distillata.

9.8 Soluzione di lavaggio A

Composizione:

Sodio Dodecil Solfato (SDS)	1	g
Acqua distillata	300	mL

Preparare la soluzione sciogliendo l'SDS in acqua distillata.
Aggiungere poi i seguenti componenti:

PBS 10x	100	mL
Tween-80	1	mL
Antischiuma A	500	µL

Portare a volume finale di 1 L con acqua distillata.

9.9 Soluzione di lavaggio B

Composizione:

Tween 20	0,5	mL
PBS 10 x	100	mL

Preparare la soluzione portando a volume finale di 1 L con acqua distillata.

9.10 Kit per la determinazione di oocisti e di cisti mediante immunofluorescenza diretta

I kit presenti in commercio sono composti da:

- anticorpi monoclonali diretti contro le oocisti di *Cryptosporidium* e le cisti di *Giardia* coniugati con Isotiocianato di Fluoresceina (FITC);
- controllo positivo;
- controllo negativo;
- tampone di lavaggio;
- soluzione di montaggio ("Mounting Medium").

10. Strumentazione e vetreria

Per lo svolgimento dell'analisi è necessario disporre di:

- apparato di filtrazione per filtri a membrana da 25 mm di diametro;
- camera umida;
- centrifuga refrigerata (intorno a +4°C) a rotore basculante per contenitori da 50-500 mL;
- contalitri;
- contenitori da centrifuga in polipropilene (PP) o in etilene propilene fluorato (teflon-FEP), da 50 mL con fondo conico;

- filtro a membrana in acetato di cellulosa con porosità nominale 1,2 µm, diametro 142 mm;
- membrane in policarbonato, di porosità 1,2 µm e di diametro 25 mm;
- microscopio a epifluorescenza con filtri di eccitazione 450-490 nm, filtro barriera 515-520, obiettivi 20, 40 e 100x ed oculare con micrometro lineare. È necessario disporre del contrasto di fase o, meglio, del contrasto ad interferenza differenziale (DIC) per l'obiettivo 100x;
- regolatore di flusso;
- supporto per filtro a membrana da 142 mm;
- tubi semirigidi di connessione con relativi raccordi e fascette.

11. Procedura

11.1 Campionamento e filtrazione

Il metodo consente di analizzare volumi variabili d'acqua (5-400 L) in relazione alla sua torbidità, usando eventualmente più membrane per filtrare il volume appropriato.
La pompa aspirante è connessa al supporto per il filtro a membrana mediante tubo semirigido e un prefiltro (porosità 100-300 µm) è interposto tra la pompa ed il supporto stesso. Nella filtrazione si consiglia di non superare la pressione di circa 2 bar.
Rimuovere la membrana dal supporto mediante pinzette e porla in una provetta da centrifuga da 50 mL. Durante il trasporto mantenere le provette alla temperatura di circa +4°C. Conservare alla stessa temperatura se non si procede subito alla dissoluzione. Si consiglia di trattare il campione entro 24-48 ore dal prelievo.

11.2 Dissoluzione della membrana

Riempire la provetta con acetone (9.1) fino a portarlo a 50 mL. Agitare mediante vortex per 2-3 minuti, fino alla completa dissoluzione della membrana.
Centrifugare a 7000 x g per 15 minuti e attendere che il rotore si fermi senza usare il freno. Scartare il supernatante facendo attenzione a non disturbare il "pellet" (arrestandosi a 2 cm dal fondo). Riempire nuovamente la provetta con acetone e risospendere il "pellet" agitando mediante vortex o eventualmente con l'aiuto di una pipetta. Centrifugare a 7000 x g per 15 minuti. Eliminare il supernatante come sopra indicato.

11.3 Lavaggi del "pellet"

Portare il "pellet" a 50 mL con etanolo (9.2) e risospenderlo mediante vortex. Centrifugare a 7000 x g per 15 minuti, aspirare il supernatante sospendere nuovamente il "pellet" portandolo a 50 mL con etanolo al 70% (9.3) ed agitando. Centrifugare a 7000 x g per 15 minuti, scartare il supernatante e risospendere il "pellet" con la soluzione di lavaggio A (9.8), sempre portandolo a 50 mL. Agitare mediante vortex. Centrifugare a 7000 x g per 15 minuti, scartare il supernatante e risospendere il "pellet" in PBS 1x (volume finale del campione circa 1-5 mL). Misurare il volume. Il trattamento può essere sospeso in questa fase aggiungendo al campione un uguale volume di soluzione tamponata di formaldeide al 10% (9.4).
Qualora il procedimento di concentrazione porti ad un campione finale con eccessiva torbidità, per un'analisi diretta al microscopio a fluorescenza si procede alla chiarificazione del campione.

11.4 Chiarificazione per flottazione

Procedere come al Paragrafo (5.3).

11.5 Determinazione mediante immunofluorescenza diretta

Procedere come al Paragrafo (5.4).

11.6 Esame microscopico

Procedere come al Paragrafo (5.5).

11.7 Interpretazione dei risultati

Procedere come al Paragrafo (5.6).

12. Espressione dei risultati

Procedere come al Capitolo (6).

13. Resoconto di prova

Il resoconto di prova deve indicare il metodo utilizzato ed esprimere i risultati come numero di microrganismi per volume di campione. Deve altresì indicare tutti i dettagli operativi, nonché qualsiasi inconveniente in grado di avere influenzato i risultati.

BIBLIOGRAFIA

ALDOM J.E. & CHAGLA A.H. (1995): "Recovery of *Cryptosporidium* oocysts from water by a membrane filter dissolution method", *Appl. Environ. Microbiol.*, **20**, 186-187.

GRACZYK T.K., CRANFIELD M.R. & FAYER R. (1997): "Recovery of waterborne oocysts of *Cryptosporidium* from water samples by the membrane-filter dissolution method", *Parasitol. Res.*, **83**, 121-125.

GRACZYK T.K., FAYER R., CRANFIELD M.R. & OWENS R. (1997): "*Cryptosporidium parvum* oocysts recovered from water by the membrane dissolution method retain their infectivity", *J. Parasitol.*, **83** (1), 111-114.

8000 - METODI ECOTOSSICOLOGICI

Premessa

Questa nuova edizione del manuale dei Metodi Analitici per le Acque presenta un gruppo di metodi tossicologici molto più nutrito rispetto all'edizione precedente. Buona parte di questi metodi, tuttavia, sono stati messi a punto per rispondere al precedente Decreto Legislativo n. 133 del 1992 che, in materia di scarichi industriali di sostanze pericolose, richiedeva metodi atti al rilevamento delle caratteristiche qualitative tanto dello scarico che del recettore. L'attuale D.Lgs. 152/99 ha abrogato quello come altri precedenti decreti, senza peraltro inficiare complessivamente la validità dei metodi fin qui prodotti. Secondo l'attuale decreto, infatti, ogni volta che un corpo idrico dimostra un livello qualitativo inferiore a "buono" o uno scarico evidenzia una tossicità superiore al limite di accettabilità, devono essere attivate indagini di approfondimento volte ad identificare e rimuovere le cause del degrado. Generalmente, indagini di questo tipo richiedono confronti sia nel tempo che nello spazio, richiedono cioè dei dati che, per quanto riguarda la tossicità, possono essere forniti solo da procedure di saggio come quelle proposte.
Se l'utilità dei metodi presentati è fuori discussione, non per questo si possono ignorare alcuni problemi. Ad esempio, non sono stati ancora proposti né un metodo di saggio con specie algali né un metodo di saggio cronico con *Daphnia magna*, sebbene entrambi siano da tempo impiegati con finalità di ricerca e di controllo. Nel caso del crostaceo marino *Mysidopsis bahia*, l'applicabilità del metodo sembra essere limitata dalla difficoltà di importare organismi che non sono garantiti come indenni da virosi. E non ultimo, è evidente un certo grado di disomogeneità nella impostazione dei metodi, dovuta, in parte, ai differenti anni di nascita dei metodi stessi. A questo proposito, il metodo *daphnia*, che era originalmente concepito per la Legge Merli, è stato con alcune modifiche reso idoneo alle nuove condizioni di saggio su effluenti di scarico previste dal D.Lgs. 152/99.
È chiaro quindi che, se da un lato i metodi presentati sono un buon punto di partenza, dall'altro altre iniziative dovranno essere intraprese ed opportunamente coordinate allo scopo di garantire la migliore applicabilità del D.Lgs. 152/99.
A tal fine, pur se non presente tra le specie consigliate dal suddetto Decreto per la valutazione dell'accettabilità di uno scarico, il manuale riporta il metodo per trota iridea. Tale saggio infatti può dare importanti contributi alle indagini tossicologiche.

Considerazioni generali

I saggi di tossicità con animali acquatici vengono effettuati per valutare se un dato composto, una miscela di composti o un campione d'acqua di scarico sono tossici e, in caso positivo, per definire il grado di tossicità o i valori di diluizione compatibili con la vita acquatica.
Nel passato sono stati condotti saggi con organismi di una sola specie allo scopo di aumentare il grado di protettività del dato ottenuto; oggi si tende a sviluppare saggi "multispecie", condotti con organismi di livelli trofici diversi (batteri, alghe, crostacei, pesci).
Con i "test" riportati in questo volume si amplia ancora di più la possibilità di utilizzare metodi specifici in funzione delle esigenze del controllo e quindi di consentire sempre più quella valutazione della "qualità ecologica" delle acque verso cui si sta indirizzando la politica europea relativamente al controllo delle risorse idriche. Accanto ai "test" di tossicità acuta sono stati sviluppati "test" di tossicità di tipo cronico (prolungato). Si tratta di saggi mediamente più impegnativi dei rispettivi saggi acuti ma che, a differenza di questi, possono fornire risultati con un contenuto informativo assolutamente superiore e quindi di grande valore per chi aspiri ad un'effettiva tutela della vita acquatica.

In questa sezione viene dato ampio spazio agli aspetti operativi che precedono l'esecuzione del "test" (trasporto e mantenimento degli organismi, scelta dell'acqua e delle attrezzature per l'acclimatazione e l'alimentazione degli organismi) e che costituiscono un aspetto fondamentale per la corretta riuscita del saggio e per la riproducibilità dello stesso.
In considerazione della specificità di questo raggruppamento rispetto ai precedenti (Metodi fisici, chimici e chimico-fisici e Metodi microbiologici) tutti gli aspetti di carattere generale quali, campionamento, attrezzature, reattivi e metodi di calcolo sono trattati nei singoli saggi.

8010. Metodi di valutazione della tossicità con pesci

METODO A - Valutazione della LC_{50}

1. Generalità

1.1 Principio del metodo

Questo metodo, adottato nei casi in cui si presenti la necessità di salvaguardare ambienti biologici specifici od organismi particolari, si basa sulla determinazione della tossicità acuta espressa dalla LC_{50}, che è la diluizione alla quale il 50% degli animali considerati muore in un tempo prestabilito (24-48 ore o più). Tale diluizione viene determinata con un saggio preliminare ed uno definitivo: il saggio preliminare serve ad individuare l'ambito approssimato di diluizione entro il quale si trova la LC_{50}; il saggio definitivo invece permette di precisarne il valore. Per stabilire quali sono i rapporti di diluizione che debbono essere rispettati perchè l'ambiente biologico che riceverà le acque esaminate sia salvaguardato nella sua funzionalità, occorrerà infine che dalla LC_{50} venga calcolata la "diluizione di sicurezza".

1.2 Interferenze

Nella valutazione della tossicità le principali interferenze possono essere rappresentate da mortalità dovute a livelli troppo bassi di ossigeno, da perdite di sostanze tossiche (per esempio volatili) o da altre cause che aumentino o riducano la tossicità del campione (per esempio precipitazione di sali di metalli pesanti, variazioni di pH, ecc.). Qualora l'analisi chimica abbia dimostrato che queste interferenze effettivamente esistono, la loro eliminazione potrà aver luogo essenzialmente in due modi:

1) sostituendo le soluzioni in esame con frequenza maggiore di quella prevista dal metodo, oppure operando con apparecchiature che permettano un ricambio continuo della soluzione in esame;
2) fornendo l'ossigeno necessario in modo tale da compensare quello utilizzato nei processi ossidativi dell'acqua e per la respirazione degli animali.

Controlli dovranno assicurare che durante tutto il periodo delle prove il livello di ossigeno si mantenga fra il 60 e 100% della saturazione.

1.3 Raccolta e conservazione dei campioni

Il volume del liquido necessario alle prove dipende dalla composizione e dal grado di tossicità del liquido stesso (in genere 10÷20 litri sono sufficienti). I campioni vanno raccolti in recipienti riempiti completamente e conservati a circa 4°C.

2. Apparecchiature

Per le prove di tossicità di tipo convenzionale (cioè a liquido non ricambiato in modo continuo), le apparecchiature necessarie sono rappresentate da vasche di vetro o bottiglie a collo

largo. Ne occorre una serie di almeno 8 della capacità minima di litri 4 (per il saggio preliminare), ed una serie di almeno 4 della capacità minima di litri 10 (per il saggio definitivo). La forma dei recipienti non ha grande importanza a condizione che la profondità del liquido non sia inferiore ai 15 cm. È inoltre indispensabile poter regolare (con bagni o camere termostatate) la temperatura dei liquidi in esame durante tutto il tempo della prova. L'ambito di temperatura utile è compreso, orientativamente, tra 15 e 25°C, con oscillazioni di ±1°C. Le temperature d'esperimento saranno prestabilite in funzione della temperatura massima osservata nel corpo recipiente in cui verrà scaricata l'acqua in esame. Occorrono infine vasche di stabulazione nelle quali conservare gli animali prima del loro impiego. L'acqua di queste vasche dovrà essere portata gradualmente alla temperatura alla quale si effettueranno le prove, curando che rimanga limpida (con riciclo su carbone o con ricambio in maniera continua) e ad un adeguato livello di ossigenazione (60÷100%) ottenibile con gorgogliamento d'aria. Nel caso di vasche a riciclo, occorrerà sostituire l'acqua di stabulazione con una frequenza che dipende dalla densità degli animali, e dalle loro esigenze. Analisi di alcune caratteristiche chimiche dell'acqua (per esempio $N\text{-}NH_3$) eseguite in tempi successivi, potranno dare utili indicazioni sulla frequenza del ricambio. Questo sistema di stabulazione è comunque da adottarsi solo quando manchi ogni possibilità di un continuo ricambio. In tali circostanze il periodo di stabulazione dovrà essere ridotto al minimo indispensabile.

3. Animali per il saggio e soluzioni

3.1 Animali per il saggio

Il metodo A, per definizione richiede che gli animali da usare nelle prove di tossicità vengano scelti in base all'interesse locale e contingente. Tale scelta cade generalmente sui pesci, ma anche altri rappresentanti della biocenosi acquatica possono essere utilizzati con successo (crostacei, insetti, ecc.) purché sufficientemente sensibili e tali da garantire la sopravvivenza anche alle altre componenti della citata biocenosi. In tutti i casi, è condizione indispensabile che i soggetti prescelti sopportino bene le condizioni di acquario, e questa possibilità va controllata in base al loro comportamento e alla mortalità osservata durante il periodo di acclimatazione che precede le prove. Quando la mortalità naturale supera il 10%, il lotto intero di animali deve essere accantonato e rimesso in uso solo quando detta mortalità receda. Occorre inoltre che gli animali siano assolutamente sani e di dimensioni omogenee: nel caso dei pesci sono preferibili soggetti di lunghezza corporea tra 5 e 10 cm. È altresì indispensabile che la loro classificazione sia effettuata con esattezza e che il nome scientifico sia indicato fino alla specie. Nell'ambito nazionale le specie di Pesci cui si fa generalmente ricorso per prove tossicologiche sono le seguenti: *Salmo gairdinerii* (trota iridea) attualmente denominata *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo truffa fario* (trota di fiume), *Phoxinus laevis* (sanguinerola), *Alburnus albidus* (alborella), *Leuciscus cephalus cadeda* (cavedano). Queste specie si possono ottenere dalle pescicolture o raccogliere nella maggior parte delle acque italiane. Durante il periodo di stabulazione, gli animali devono essere regolarmente ed opportunamente alimentati (sospendendo la somministrazione del cibo il giorno prima che inizino le prove e durante le prove stesse) e acclimatati alla temperatura alla quale si effettuerà il test.

3.2 Numero di animali e volume di liquido

Nel "test" preliminare, il numero minimo di animali da usare può essere di 2 per ogni diluizione e, in questo caso, anche il volume del liquido in esame potrà essere ridotto a 4 litri. Per la prova definitiva occorreranno invece almeno 10 soggetti per ogni diluizione a meno di non operare con organismi diversi dai pesci (crostacei, insetti ecc.) per i quali il numero dovrà essere più elevato (oltre 20). Il rapporto tra il peso complessivo degli animali ed il volume di acqua che li contiene dovrà essere stabilito in funzione di numerosi fattori e soprattutto con determinazioni del contenuto di ossigeno residuo. Poiché, usando 10 animali ciascuno del peso di 10 grammi occorrerebbero considerevoli volumi di liquido, si consiglia di superare la difficoltà che comporta l'uso di grandi vasche operando con animali di minori dimensioni o areando il liquido in esame.

3.3 Acqua di diluizione

In questo metodo, la condizione ideale sarebbe quella di poter effettuare le necessarie diluizioni del campione con l'acqua prelevata in una zona pura dello stesso corpo recipiente. Poiché ciò è raramente possibile (il corpo recipiente può essere già contaminato oppure possono essere necessari volumi di acqua troppo elevati), il diluente dovrà essere ricavato da altra fonte e corretto nelle sue principali caratteristiche (ad esempio pH, alcalinità e durezza) fino ad avere una composizione chimica simile a quella media del corpo recipiente.

4. Procedimento

4.1 Saggio preliminare

Tale saggio deve indicare se esiste una tossicità e, in caso positivo, quale sia dopo 24 ore l'ambito di diluizione entro il quale si trova la LC_{50}. A questo scopo si prepara, con gli accorgimenti indicati in precedenza, una vasca di 4 litri contenente il campione in esame tal quale (al 100%) e si controlla se il campione è tossico, introducendovi un piccolo gruppo di animali (per esempio 2 pesci). Se il campione non è tossico, il controllo di non tossicità viene prolungato a 48 ore, se invece entro le 24 ore si sono avuti esiti parziali o totali di mortalità, si procede all'allestimento delle diluizioni secondo una serie ad intervalli logaritmici uguali.
Per esempio: 100 - 89,1 - 79,4 - 70,8 - 63,1 - 56,3 - 50,1 - 44,7 - 39,8 - 35,5 - 31,6 - 28,2 - 25,1 - 22,4 - 19,9 - 17,8 - 15,8 - 14,1 - 12,6 - 11,2 – 10, ecc. (*).
Esattamente a 24 ore di distanza dall'introduzione degli animali, la prova effettuata permetterà di individuare l'intervallo compreso tra la diluizione in cui la totalità o una parte soltanto (più della metà) degli animali usati è deceduta e quella che ha causato la morte solo di una parte (inferiore alla metà) o di nessuno degli animali usati. E evidente che, quando il saggio preliminare venga condotto con un elevato numero di intervalli di diluizione, l'ambito cercato (e cioè quello in cui si trova la LC_{50}) sarà più ristretto e la prova definitiva più agevole da effettuare.

4.2 Saggio definitivo

Quando nei recipienti contenenti il campione tal quale (100%) la sopravvivenza sia totale anche dopo 48 ore, il saggio definitivo consisterà semplicemente nel ripetere la prova con un numero maggiore di animali (almeno 10) con un maggiore volume di liquido. Quando invece con il saggio preliminare sia stato individuato l'ambito in cui si trova la LC_{50}, il saggio definitivo dovrà servire ad indicare quali sono le diluizioni che determinano, dopo 24 e 48 ore, percentuali di sopravvivenza inferiori (ma non nulle) al 50% e superiori (ma non totali) al 50%. Allo scopo si preparano alcune soluzioni nell'intervallo individuato attraverso le prove preliminari, diluendo secondo lo schema degli intervalli logaritmici e vi si introducono gli animali, annotando dopo 24 ore le percentuali di sopravvivenza come nel caso precedente e protraendo l'osservazione per 48 ore (gli animali che muoiono devono essere rimossi dalle vasche appena possibile). Se dopo i tempi indicati si ottengono i risultati necessari si può procedere al calcolo della LC_{50}. Diversamente, occorre ripetere la prova selezionando altri intervalli di diluzione.

5. Determinazione grafica della LC_{50}

Si portano su carta logaritmica le percentuali di sopravvivenza osservate per due diluizioni successive (diluizioni sulla scala logaritmica) dopo 24 ore. Si uniscono con una retta i due punti

(*) L'andamento del saggio effettuato con il campione tal quale dà in linea di massima già un'indicazione: per esempio con un campione che al 100% abbia causato la morte in circa 2 ore di tutti gli animali si potrà allestire la serie delle diluizioni alle concentrazioni del 25,1 - 12,6 - 6,31 - 3,16 e 1,58%, mentre con un campione poco tossico si potrà utilizzare la serie 100 - 79,4 - 63,1 - 50,1. Quando una scelta a priori non sia possibile, occorrerà allestire una serie di prove tra 100 e 0,1%, per esempio 100 - 31,6 - 10 - 3,16 - 1 - 0,361 - 0,1.

situati, per quanto detto in precedenza, sopra e sotto la linea del 50% e, dal punto in cui la retta interseca la linea del 50%, si traccia una perpendicolare all'asse delle diluizioni, ottenendo un valore corrispondente alla LC_{50}-24 ore. Lo stesso procedimento si segue utilizzando le percentuali di sopravvivenza annotate a 48 ore, ottenendo così la LC_{50}-48 ore (Fig. 1).
Valutazioni più accurate della LC_{50} possono essere effettuate con le metodologie di calcolo riportate in appendice ai metodi che utilizzano la *Daphnia*.

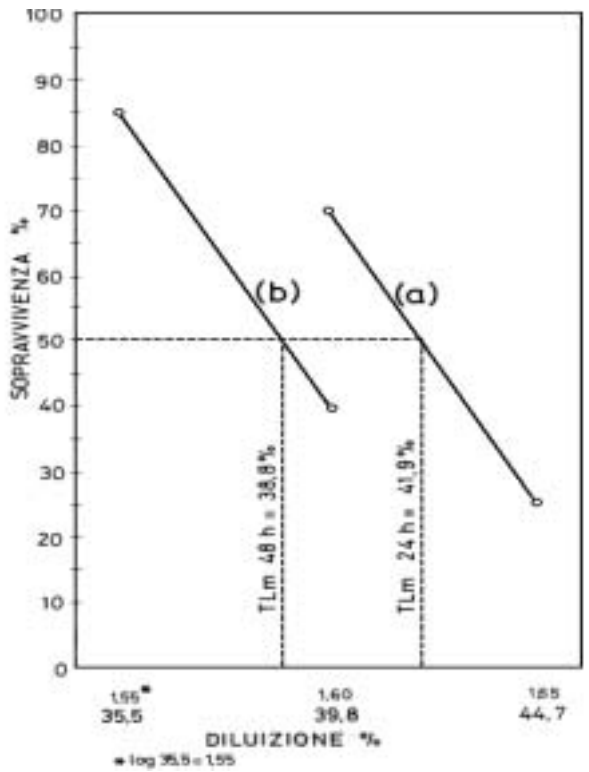


Figura 1: Determinazione grafica della LC_{50}.
* I valori di sopravvivenza più indicativi e più corretti per il calcolo della LC50 sono quelli che si trovano per le diluizioni tra il 20 e 1'80%.

6. Calcolo della diluizione di sicurezza

La LC_{50} calcolata con il metodo descritto non è evidentemente utilizzabile tal quale; in questo caso non solo si esige che il 100% di detta popolazione sopravviva, ma occorre anche prevenire gli eventuali effetti nocivi che si potrebbero verificare in un tempo maggiore di quello previsto dal metodo A. I valori di LC_{50}-24 e 48 ore vengono a questo scopo elaborati come segue:

$$D = \frac{LC_{50}48h \times 0{,}3}{\left[\frac{LC_{50}24h}{LC_{50}48h}\right]^2}$$

dove D è la diluizione di sicurezza cercata.
Questa diluizione, adottando animali molto sensibili, quali ad esempio i Salmonidi, può dare sufficienti garanzie ai fini della protezione dell'intero ambiente biologico.

Esempio: Un campione di acqua contaminata deve essere immesso in un fiume di cui è ne-

cessario salvaguardare l'intera biocenosi. Occorre stabilire di conseguenza, qual è nel caso specifico la diluizione di sicurezza, adeguando il più possibile le condizioni sperimentali a quelle del corpo recipiente (temperatura, caratteristiche del diluente, specie di animali da utilizzare, ecc.). La ricerca è condotta in due tempi:

Saggio preliminare con 2 animali per ogni diluizione

La prova del campione tal quale dà il seguente esito: entrambi gli animali muoiono in 6 ore. Si procede di conseguenza all'allestimento di almeno 4 diluizioni, per esempio quelle comprese tra il 79,4 e il 19,9%. (cioè 79,4 - 50,1 - 31,6 - 19,9%. Se è il caso i valori possono essere approssimati). A 24 ore di distanza la prova preliminare dà il seguente esito: alle diluizioni 79,4 e 50,1 si ha sopravvivenza nulla; alle diluizioni 31,6 e 19,9 si ha sopravvivenza totale. Di conseguenza la LC_{50} si troverà tra 50,1 e 31,6%.

Saggio definitivo con 2 animali per ogni diluizione

Si preparano 3 diluizioni comprese tra 50,1 e 31,6% ad intervalli logaritmici eguali e cioè 44,7 - 39,8 e 35,5%. Si introducono 20 animali per ogni diluizione e si annotano i sopravviventi a 24, 48 e 96 ore. Nell'esempio gli esiti di questa prova sono:

Diluizione	44,7%	39,8%	35,5%
Animali sopravviventi a 24 h	5 (25%)	14 (70%)	20 (100%)
Animali sopravviventi a 48 h	0 (-)	8 (40%)	17 (85%)

Si portano su un grafico semilogaritmico (Fig. 1) le diluizioni (in scala logaritmica) e le % di sopravvivenza osservate alle 24 ore (il 100% di sopravvivenza non è utilizzabile così come lo 0%). Si congiungono i due punti con una retta (a nella figura). Dal punto di intersezione con la linea del 50% si traccia la perpendicolare all'asse delle diluizioni ottenendo il valore logaritmico 1,622 il cui corrispondente in % è la LC_{50}-24 h = 41,9%. Con analogo procedimento si trova la LC_{50} a 48 ore che è 38,8% (b nella figura). La diluizione di sicurezza, applicando l'equazione riportata al paragrafo 6, di conseguenza è:

$$D = \frac{0{,}3 \times 38{,}8}{\left[\frac{41{,}9}{38{,}8}\right]^2} = 9{,}98\%$$

Se lo scarico in questione ha una portata per esempio di 8 litri al secondo si potrà così calcolare la portata minima (Q) che il corpo recipiente dovrà avere perchè non abbiano luogo eventi tossici di nessun genere:

$$Q = \frac{8(100 - 9{,}98)}{9{,}98}$$

Dopo diluizione la portata sarà quindi di 80 litri al secondo.

7. Controlli e precisione del metodo

Le prove di tossicità esigono controlli soprattutto quando la mortalità ottenuta, nel periodo che precede le prove sia al limite del valore accettabile (10%). I controlli vanno effettuati allestendo, con il solo diluente, delle vasche in condizioni identiche a quelle delle prove. Quando, durante la prova, si osservano tra gli animali di controllo mortalità superiori al 10%, la prova va ripetuta usando un altro lotto di animali.

La valutazione della LC_{50} può essere resa più precisa, impiegando carta di probabilità o usando metodi statistici basati sul calcolo, anzichè sull'estrapolazione grafica della LC_{50}.
Ai fini abituali per i quali vengono condotte queste determinazioni, il metodo descritto può essere tuttavia considerato soddisfacente. Incidono però sulla precisione del metodo anche altri fattori (numero e cariche degli animali, ampiezza dell'intervallo tra le diluizioni, uniformità della metodologia adottata, ecc.), che possono essere in buona parte ridotti aumentando il numero dei soggetti, riducendo gli intervalli tra le diluizioni ed adottando metodi con ricambio continuo o intervallato del liquido in esame.

8. Espressione dei risultati

I risultati del saggio tossicologico vengono espressi in termini di LC_{50} a 24 e a 48 ore (in volumi % del campione originale o altra unità). È indispensabile che accanto ai due valori di LC_{50} vengano indicate le condizioni sperimentali adottate e in particolare: specie usata, temperatura di esperimento, caratteristiche del diluente, modalità di ossigenazione, condizioni chimiche all'inizio e alla fine delle prove, volume del liquido usato, numero, dimensioni e peso degli animali.

METODO B - Valutazione dell'accettabilità di un effluente

1. Generalità

1.1 Campo di applicazione del metodo

Il metodo B prevede, per un giudizio di accettabilità delle acque di scarico, che il campione in esame diluito 1:1 con acqua standard, consenta la sopravvivenza di almeno il 50% degli animali usati per il saggio il carassio e la trota per un periodo di 24 ore, alla temperatura, rispettivamente, di 20°C e 15°C, e in condizioni di aerazione.
Il metodo quindi, a differenza di quello descritto in precedenza, è rigorosamente standardizzato per la necessità di operare in condizioni confrontabili nell'esecuzione dei controlli sui diversi scarichi.

1.2 Principio del metodo

Il metodo consiste nel valutare il numero di animali che sopravvivono dopo un periodo di 24 ore a contatto con il campione di effluente, in condizioni sperimentali standardizzate e ad un'unica diluizione (50% con acqua standard).

1.3 Raccolta e conservazione dei campioni

Il volume del campione necessario per il saggio è di 20 litri. Di questi, 10 vengono utilizzati per il saggio e 10 vengono tenuti come riserva nel caso che quest'ultimo debba essere ripetuto.
Il campione va conservato a 4°C per non oltre 2 giorni in recipiente riempito completamente.

2. Apparecchiature, reattivi e animali per il saggio

2.1 Apparecchiature

Sono necessarie due vasche di vetro o di altro materiale inerte di almeno 20 litri di capacità. La forma dei recipienti non ha grande importanza, a condizione che sia assicurato un battente di almeno 15 cm. Particolarmente adatte possono essere vasche di cm 50x25 di base e cm 20-30 di altezza.
Le vasche per il saggio con trota devono essere fornite di una ricopertura a rete. Per la ter-

moregolazione sono necessari bagni o camere termostatiche alla temperatura di 15°C (saggio con trota) e 20°C (saggio con carassio).
Per quanto riguarda l'aerazione, le vasche devono essere fornite di un gorgogliatore ad aria che consenta di mantenere la concentrazione dell'ossigeno tra il 40 e il 100% di saturazione durante tutto il saggio.
Per le vasche di stabulazione vedasi il Capitolo 2 del metodo A.

2.2 Acqua standard

L'acqua standard, da utilizzare per la diluizione del campione di effluente e per il saggio di controllo, va preparata con i seguenti sali:

$NaHCO_3$	mg/L 192
$CaSO_4 \cdot 2H_2O$	mg/L 120
$MgSO_4$	mg/L 120
KCl	mg/L 8

I sali elencati vanno disciolti, nelle quantità indicate, in acqua distillata o deionizzata e la soluzione va aerata prima dell'uso. Il pH che si ottiene dopo aerazione è di 7,8-8, la durezza è 160-180 mg/L $CaCO_3$ e l'alcalinità 110-120 mg/L $CaCO_3$.

2.3 Animali per il saggio

Per il saggio con carassio si utilizzano animali della specie *Carassius auratus* di 5-6 cm di lunghezza.
Per il saggio con trota s'impiegano animali della specie *Salmo gairdneri* (= *Oncorhynchus mykiss*) di 8-12 cm di lunghezza. Per quanto riguarda le condizioni di stabulazione si rinvia al Capitolo 2 e al paragrafo 3.1 del metodo A.

2.4 Numero di animali e volume del campione

Per ogni prova sono necessari 10 animali che dovranno essere mantenuti in vasche contenenti 20 litri di campione da saggiare opportunamente diluito, aerato e termostatato.

3. Procedimento

Si preparano due contenitori per il saggio. In uno vengono travasati 10 litri del campione da saggiare e 10 di acqua standard, nell'altro 20 litri di acqua standard. Si procede all'aerazione e alla termostatazione a 15°C (trota) o a 20°C (carassio).
A condizioni operative raggiunte, si trasferiscono dalle vasche di stabulazione (che devono avere la stessa temperatura del saggio) 10 animali nella vasca con il campione diluito e 10 in quella con il solo diluente (controllo). Il trasferimento va eseguito utilizzando un retino che consenta di effettuare tutte le operazioni con rapidità e senza eccessivo stress per gli animali. A 2-3 ore dall'inizio del saggio si verificano le condizioni di ossigenazione e si regola l'aerazione in modo da mantenere la saturazione sopra il 40% nel caso del carassio e sopra il 60% in quello della trota.
Dopo 24 ore si rileva il numero degli animali sopravvissuti.
Se durante la prova si osservano mortalità, gli organismi deceduti vanno rimossi dalle vasche.

4. Risultato del saggio

Il campione in esame è giudicato accettabile se al termine della prova, sopravvivono 5 o più animali.
Se nella vasca di controllo si è registrato anche un solo decesso la prova va ripetuta.

8020. Metodi di valutazione della tossicità con *Daphnia*

1. Materiali e strumentazione per il saggio

I materiali si riducono di fatto ad una serie di recipienti aventi un volume utile di 50 mL. Per la valutazione della tossicità di sostanze volatili i recipienti devono poter essere ermeticamente chiusi. Come ogni altro oggetto destinato ad entrare in contatto con l'acqua di allevamento o con i campioni da saggiare, non devono dar luogo a processi di adsorbimento o di rilascio di sostanze che possono interferire con il saggio. A questo fine vengono utilizzati recipienti in vetro borosilicato o in plastiche fluorurate.
Durante il saggio non è infrequente che alcuni animali si portino in superficie e, per ragioni di tensione superficiale o di adesione di bollicine d'aria alle strutture corporee, non possono ridiscendere nel liquido sottostante. Se l'inconveniente dovesse porsi con sistematicità, si potrà fare ricorso a reticelle in teflon di circa 1 mm di maglia mantenute sommerse a qualche mm sotto il pelo del liquido mediante un anello in teflon o altra struttura della forma interna dei recipienti usati per la prova.
Le soluzioni poste in questi recipienti devono essere mantenute a temperatura costante (20°C) e, a tal fine, può essere utilizzato un bagno termostatico o altra soluzione idonea (camera termostatica) che consenta il mantenimento della temperatura dei liquidi in esame nell'ambito di 20±1°C.
Il saggio viene eseguito in condizioni alterne di luce (16 ore) e di buio (8 ore) e, a tal fine, occorre disporre di una camera oscurabile e di un sistema di lampade fluorescenti (resa cromatica ≥ 90) che dia una illuminazione attenuata (circa 300 lux) al piano di lavoro. È opportuno che il sistema sia fornito di temporizzatore per il controllo del fotoperiodo.
Oltre a questi materiali, l'esecuzione del saggio richiede la disponibilità della normale apparecchiatura di laboratorio. Richiede inoltre un misuratore di ossigeno disciolto il cui sensore abbia dimensioni tali da permettere il rilevamento nei contenitori utilizzati per il saggio.

2 . Reagenti e acqua di diluizione

La preparazione delle soluzioni e la diluizione vengono effettuate con acqua che deve rispondere alle seguenti caratteristiche: pH 7,5-8,5; alcalinità 110-120 mg $CaCO_3$/L e durezza 140-160 mg $CaCO_3$/L. Per prepararla aggiungere a un litro di acqua deionizzata o distillata passata su colonna di carbone nell'ordine: 10 mg di KCl, 192 mg di $NaHCO_3$, 53 mg di $MgSO_4$ e 183 mg di $CaSO_4 \cdot 2H_2O$. Questa soluzione deve essere aerata per 24 ore prima del suo impiego, alla temperatura di 20°C, con aria compressa priva di contaminanti.

3. Organismi per il saggio

L'organismo utilizzato per il saggio è il crostaceo cladocero della specie *Daphnia magna* Straus, che può essere ottenuto da laboratori di idrobiologia o di tossicologia acquatica. Per i saggi vengono utilizzati i neonati di età inferiore alle 24 ore. A questo scopo, prima dell'allestimento del saggio viene individuato nelle vasche di allevamento e isolato in acqua di diluizione, un numero adeguato di femmine adulte (4-5 mm di lunghezza corporea) prossime al parto, riconoscibili per il colore aranciato delle uova presenti nella camera di incubazione. Sono da scartare colture in riproduzione sessuata con elevata mortalità, bassa nata-

lità o con altri sintomi evidenti di condizioni colturali non adeguate. Queste femmine, quando rispondono ai suddetti requisiti di idoneità, potranno deporre un numero di neonati ciascuna, generalmente compreso tra 20 e 50.

METODO A - Valutazione della EC_{50}

a) La soluzione del prodotto da esaminare va preparata utilizzando come solvente l'acqua standard debitamente aerata. Ai fini di una corretta conduzione del saggio è consigliabile acquisire alcune informazioni essenziali sui prodotti in esame, quali la solubilità in acqua e la tensione di vapore. Nel caso di tossici poco solubili sono da privilegiare i metodi di dispersione meccanica rispetto all'impiego di sostanze solubilizzanti. Qualora l'impiego di queste ultime si renda necessario, sono da utilizzare quelle a minore tossicità per la *daphnia*. In ogni caso nella valutazione dei risultati va tenuto conto che questi possono essere dovuti all'azione combinata della sostanza in esame e dell'agente solubilizzante.
b) Per la valutazione della EC_{50} di effluenti occorre disporre di un volume di almeno 1 L di campione. Se la prova viene allestita entro 6 ore, il campione non va refrigerato a 4 °C, necessità che invece si pone se la prova viene effettuata entro 48 ore dal prelievo. Si consiglia tuttavia, l'utilizzo immediato del campione in quanto la conservazione comporta modificazioni di entità non prevedibile.
c) Il prodotto o l'effluente in esame vengono saggiati in un primo momento con una prova preliminare e successivamente con una prova definitiva. La prova preliminare si effettua operando con 5 diverse concentrazioni o diluizioni e una sola replica per ciascuna di esse. Il numero di contenitori necessario in questo caso è quindi sei, di cui uno di controllo con il solo liquido diluente. Queste concentrazioni di prodotto in esame o diluizioni di effluente vengono scelte in progressione geometrica. Nel caso di effetti tossici del tutto ignoti, si può procedere secondo un fattore 10 e la serie delle 5 concentrazioni o diluizioni può essere indicativamente la seguente: 0,01 mg/L; 0,1 mg/L; 1 mg/L; 10 mg/L; 100 mg/L di prodotto o % (v/v) di effluente.
d) Individuato l'ambito di tossicità, viene allestita la prova definitiva effettuata con quattro repliche e secondo una serie ad intervalli meno ampi (ad esempio 0,1-0,4-0,8-1,6). Il numero di contenitori necessari in questo caso è 24, di cui 20 verranno usati per saggiare in quadruplo le 5 concentrazioni o diluizioni e 4 per la prova di controllo con la sola acqua di diluizione. Nel caso di tossici volatili dovranno essere usati contenitori a chiusura ermetica e completamente riempiti. Il volume di questi recipienti deve essere tale che l'ossigeno disciolto al termine della prova non risulti inferiore a 2 mg/L.
e) In tutti i casi in cui sia possibile, è consigliato il controllo analitico delle concentrazioni del tossico in esame. Se lo scostamento tra la concentrazione misurata e quella nominale è superiore al 20%, i risultati del saggio dovranno essere basati sulla concentrazione misurata.
f) In ogni contenitore vengono trasferiti 50 mL della soluzione in esame.
g) In ciascuno dei 24 recipienti vengono quindi trasferiti 5 neonati di *daphnia*. Questa operazione va condotta in modo da non danneggiare gli animali e, a questo scopo, si utilizza una pipetta in vetro dal diametro interno di circa 3-5 mm provvista di bulbo elastico per l'aspirazione. I trasferimenti devono essere effettuati immergendo la pipetta sotto la superficie e rilasciando lentamente il liquido contenente gli animali. L'operazione deve essere condotta riducendo al minimo il volume d'acqua aspirato con le *daphniae* al fine di non diluire in modo significativo il campione in esame. Allo scopo di rispettare alcune esigenze di distribuzione casuale degli animali, è opportuno che il trasferimento ai recipienti delle prove venga effettuato ponendo alternativamente le *daphniae* pipettate nei diversi recipienti fino a raggiungere il numero di 5, anziché completare un recipiente per poi passare al successivo.
h) A trasferimento avvenuto si registra l'ora di inizio della prova e questa viene condotta senza modificare il fotoperiodo al quale gli animali sono stati allevati.
i) Durante questo periodo agli animali non viene somministrata alcuna alimentazione.
l) Al termine del saggio e, se necessario con l'aiuto di una lente, si contano gli organismi immobili e cioè incapaci di attività natatoria anche dopo leggera agitazione del contenitore.

m) Se nelle soluzioni di controllo gli organismi immobili o galleggianti superano complessivamente il 10%, il saggio va ripetuto.
n) Il saggio dovrà essere ripetuto anche quando dopo le 24 ore della prova, in presenza di casi di immobilizzazione, la concentrazione dell'ossigeno disciolto risulterà inferiore a 2 mg/L. In questo caso il nuovo saggio dovrà essere allestito ricambiando le soluzioni in esame durante le 24 ore della prova, oppure equipaggiando i recipienti con sistemi di aerazione che non diano luogo a turbolenza o ad altri inconvenienti dannosi per gli animali.
o) Con i dati raccolti nella prova a 24 ore può essere calcolata la $24hEC_{50}$ (in mg/L oppure in % di diluizione) e i rispettivi limiti fiduciali. La condizione necessaria per questi calcoli è che vi siano almeno due casi di parziale immobilizzazione (diversi cioè da 0 e 100%) e prossimi, possibilmente, al 50%. Se questa condizione non è raggiunta si può fare ricorso ad altri metodi di calcolo oppure si può ripetere la prova operando in un ambito più idoneo di concentrazioni o di diluizioni.
p) Il saggio può essere prolungato per la valutazione della EC_{50} a 48 ore. A tal fine si procede al rinnovo delle 24 soluzioni con soluzioni fresche (ricorrendo nel caso di un effluente, al campione refrigerato) nelle quali vengono trasferiti gli animali che già hanno soggiornato per 24 ore nelle soluzioni a concentrazione o diluizione corrispondente.
q) La procedura, le cautele ed i criteri per la seconda parte della prova sono gli stessi già descritti.
r) Al termine della prova può essere calcolata la EC_{50} a 48 ore seguendo i criteri indicati.

METODO B - Valutazione dell'accettabilità di un effluente

a) Il campione di circa 500 mL di effluente di cui deve essere valutata l'accettabilità, va utilizzato entro le 24 ore dalla raccolta e conservato alla temperatura di 4°C. Si consiglia l'utilizzo immediato del campione in quanto la conservazione comporta modificazioni di entità non prevedibile. In ogni caso è opportuno che il campione venga suddiviso in due aliquote di almeno 250 mL di cui una verrà utilizzata per il saggio e l'altra potrà tornare utile per ulteriori prove.
b) Eventuali solidi galleggianti vanno rimossi per filtrazione su lana di vetro o su rete di teflon a maglie di circa 1 mm.
c) Si procede quindi alla regolazione della temperatura del campione prima del suo trasferimento nei recipienti per il saggio (20±1°C).
d) Per il saggio si predispongono sei recipienti di cui tre contenenti ciascuno 50 mL di effluente e tre 50 mL di sola acqua di diluizione utilizzata come controllo.
e) In ciascuno dei sei recipienti vengono trasferiti 10 neonati di *daphnia*. Questa operazione va condotta in modo da non danneggiare gli animali e, a questo scopo, si utilizza una pipetta di vetro del diametro interno di circa 3-5 mm provvista di bulbo elastico per l'aspirazione. I trasferimenti devono essere effettuati immergendo la pipetta sotto la superficie e rilasciando lentamente il liquido contenente gli animali. L'operazione deve essere condotta riducendo al minimo il volume d'acqua trasferito con le *daphniae* al fine di non diluire in modo significativo il campione in esame. Allo scopo di rispettare alcune esigenze di distribuzione casuale degli animali, è consigliabile che il trasferimento ai recipienti delle prove venga effettuato ponendo alternativamente le dafnie pipettate nei sei recipienti fino a raggiungere il numero di dieci, anziché completare un recipiente per poi passare ai successivi.
f) A trasferimento avvenuto, si registra l'ora di inizio della prova e questa viene condotta senza modificare i tempi di illuminazione ai quali gli animali sono stati allevati.
g) Durante le 24 ore della prova gli animali non vengono alimentati.
h) Al termine del saggio e, se necessario, anche con l'aiuto di una lente, si contano gli organismi immobili e cioè incapaci di attività natatoria anche dopo leggera agitazione del contenitore.
i) Il saggio va ripetuto se nelle soluzioni di controllo gli organismi immobili o galleggianti superano complessivamente il 10%.

l) Il saggio dovrà essere ripetuto anche quando dopo le 24 ore della prova in presenza di casi di immobilizzazione, la concentrazione di ossigeno disciolto risulterà inferiore a 2 mg/L. In questo caso il nuovo saggio dovrà essere allestito ricambiando il liquido in esame durante le 24 ore della prova oppure equipaggiando i recipienti con sistemi di aerazione che non diano luogo a turbolenze o ad altri inconvenienti dannosi per gli animali.

Il giudizio di accettabilità del campione in esame viene dato quando al termine delle 24 ore la somma degli organismi immobili dei tre recipienti contenenti il campione in esame, risulta inferiore al 50%; se è pari o superiore al 50% il campione viene giudicato inaccettabile. Per effluenti che recapitino in fognatura il campione è giudicato inaccettabile se la percentuale di organismi immobili è pari o superiore all'80%.

APPENDICE 1 - Allevamento di *Daphnia magna*

1. Strumentazione

Oltre alla normale strumentazione di laboratorio sono necessari:

- un sistema di illuminazione che consenta di ottenere 1000 lux a livello delle vasche (lampade fluorescenti con indice di resa cromatica ≥ 90) fornito di temporizzatore per il controllo del fotoperiodo;
- un sistema di termoregolazione atto al mantenimento della temperatura nell'ambito di 20±1°C;
- un sistema di aerazione a bassa portata e pressione fornito di diffusori a pietra porosa del tipo da acquario;
- un misuratore di ossigeno disciolto;
- una camera di conta e microscopio o contatore automatico di particelle;
- vasche in tutto vetro con una capacità di circa 5 L.

Tutti gli accessori destinati ad entrare in contatto con l'acqua di allevamento non devono rilasciare sostanze tossiche. Vetro borosilicato e plastiche florurate sono da preferire in tutti i casi in cui sia possibile.

2. Acqua

Per l'allevamento della *daphnia* le acque di rete non clorate, di falda o di un corpo idrico superficiale sono tutte potenzialmente utilizzabili purchè non contaminate. Sono da preferire quelle che presentano una sufficiente stabilità delle caratteristiche chimico-fisiche. Qualunque sia l'acqua prescelta, l'aerazione per 24 ore ed un trattamento con carbone attivo, preceduti nel caso di acque superficiali da filtrazione su membrane di 0,22 μm, assicurano un netto miglioramento della qualità. Se necessario, l'acqua trattata va corretta in alcuni dei suoi costituenti maggiori per ottenere approssimativamente una durezza di 150 mg $CaCO_3$/L, un rapporto Ca/Mg=4 e Na/K=10. La diluizione viene effettuata con acqua deionizzata o distillata filtrata su carbone attivo o con acqua Milli Q, mentre gli aumenti di concentrazione si ottengono per aggiunta di sali di grado analitico (es. $CaCl_2$, $MgSO_4$, $NaHCO_3$, KCl, ecc.).
L'acqua così preparata va saggiata per verificarne l'idoneità all'allevamento di *Daphnia magna*. A questo scopo si utilizza un gruppo di almeno dieci organismi, di età inferiore alle 24 ore, mantenuti in 500 mL di acqua ed alle condizioni previste per l'allevamento. Ogni 48 ore si provvede al trasferimento in altri 500 mL di mezzo fresco, all'aggiunta di cibo nelle quantità indicate ed alla conta, previa rimozione, dei dafnidi prodotti.
La prova ha una durata di circa 14 giorni corrispondenti a tre schiuse. Le condizioni di idoneità dell'acqua di allevamento si hanno se:

- la prima schiusa avviene entro il nono giorno;
- il numero medio complessivo di neonati per femmina dopo tre schiuse è superiore a 20 e preferibilmente prossimo a 60;
- la mortalità non supera il 20%.

Il prolungamento della prova oltre la terza schiusa è comunque consigliabile offrendo maggiori garanzie di idoneità.

3. Termoregolazione

La temperatura per il mantenimento di *Daphnia magna* è di 20±1°C.

4. Illuminazione

Le vasche di allevamento vengono illuminate con un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio.

5. Ossigenazione

Nelle vasche di allevamento viene mantenuta una concentrazione di ossigeno disciolto superiore a 6 mg/L insufflando aria mediante dei diffusori. Quest'aria può contenere contaminanti che vanno rimossi per passaggio su cartuccia di carbone attivo o altro materiale adsorbente.

6. Alimentazione e mantenimento

La dieta per il mantenimento in coltura di *Daphnia magna* è costituita da due organismi unicellulari, un'alga verde *Selenastrum capricornutum* ed un lievito *Saccharomyces cerevisiae*. Sia la sospensione algale che quella di lievito vengono somministrate quotidianamente in quantità tali da assicurare una densità nelle vasche di allevamento di circa 300.000 cellule/mL per ciascuno dei due organismi. La somministrazione può avere luogo a giorni alterni e, in questo caso, i volumi delle sospensioni cellulari vanno raddoppiati. Il permanere della torbidità del mezzo acquoso può costituire un indice visivo in base al quale rinviare la somministrazione del cibo.
Il rinnovo parziale e bisettimanale dell'acqua delle vasche come pure il controllo della densità ad un massimo di circa 100 individui/L costituiscono condizioni necessarie per una corretta conduzione dell'allevamento. A questo fine occorre inoltre effettuare il trasferimento periodico (15-20 giorni) di alcuni organismi in attiva riproduzione partenogenetica, ad una vasca contenente cibo e mezzo freschi.
È consigliabile mantenere contemporaneamente almeno due vasche, evitando in tal modo che un qualsiasi inconveniente comporti la perdita dell'organismo. L'allestimento di queste vasche è utile che sia sfalsato di alcuni giorni al fine di disporre in modo pressochè continuo dei dafnidi necessari alla sperimentazione.

7. Coltura algale

La cloroficea *Selenastrum capricornutum* viene allevata in un mezzo di coltura allestito con le seguenti modalità. Si preparano quattro soluzioni in acqua bidistillata o Milli-Q filtrata su membrana da 0,22 μm dei sali di seguito indicati:

Soluzione 1			
	$NaNO_3$	25,500	g/L
	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12,164	g/L
	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	4,410	g/L
	H_3BO_3	185,520	mg/L
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415,380	mg/L
	$ZnCl_2$	3,270	mg/L
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,428	mg/L
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,012	mg/L
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7,260	mg/L
	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	160,000	mg/L
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	300,000	mg/L
Soluzione 2			
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	14,700	g/L
Soluzione 3			
	K_2HPO_4	1,044	g/L
Soluzione 4 -	$NaHCO_3$	15,000	g/L

Il mezzo di coltura è ottenuto diluendo 2 mL di ciascuna soluzione al volume finale di 1 litro con acqua bidistillata o Milli-Q filtrata su 0,22 μm. Il mezzo viene inoculato in modo da ottenere una densità iniziale di circa 200.000 cellule/mL. Le alghe vengono incubate a 20±2°C e con una illuminazione di circa 4000 lux fornita da lampade fluorescenti cool-white con fotoperiodo di 16 ore di luce.
La sospensione algale è mantenuta in agitazione continua insufflando aria filtrata e dopo 5-6 giorni di incubazione, raggiunge di norma una densità prossima ai 9-10 milioni di cellule/mL. La biomassa algale viene separata dai residui del mezzo di coltura mediante centrifugazione (400 RCF per 5-10 minuti). Il sopranatante viene scartato e le alghe ridisperse in acqua di allevamento con durezza ridotta a 30-50 mg $CaCO_3$/L. Si fa seguire una seconda centrifugazione e quindi si procede alla raccolta delle alghe.
Le cellule algali, risospese nello stesso tipo di acqua usata per i lavaggi in modo da ottenere una densità d'impiego di circa 100 milioni di cellule/mL, possono essere conservate al buio ed alla temperatura di 4°C. In tali condizioni si mantengono vitali per oltre 30 giorni e potranno essere utilizzate per inoculare la coltura successiva.

8. Sospensione di lievito

Il lievito *Saccharomyces cerevisiae*, reperibile in confezioni commercializzate per la panificazione, viene disperso in acqua di durezza 30-50 mg $CaCO_3$/L ottenuta per miscelazione dell'acqua di allevamento con acqua bidistillata o Milli-Q. La densità d'impiego è di circa 100 milioni di cellule/mL. Anche la sospensione di lievito può essere conservata al buio ed alla temperatura di 4°C.

9. Idoneità degli organismi

È opportuno verificare periodicamente le condizioni generali di allevamento. A questo fine si può ricorrere all'esame visivo del contenuto lipidico degli organismi, indice lipidico, come pure ad una sostanza tossica di riferimento. Per quest'ultima si propone il bicromato di potassio di cui si determina la $24hEC_{50}$ nelle condizioni sperimentali indicate dal metodo.

APPENDICE 2 - Calcolo della EC_{50}

Vengono proposti tre metodi per il calcolo della EC_{50} e dei relativi limiti fiduciali. La corretta applicazione del primo metodo richiede che i risultati del saggio comprendano almeno due effetti parziali, diversi cioè da immobilizzazione 0 e 100%, quantunque esso possa fornire una stima della EC_{50} e dei limiti di confidenza anche con un solo risultato parziale. Il secondo metodo viene utilizzato in assenza di effetti intermedi fra 0 e 100% e quando non siano necessarie particolari informazioni sulla relazione concentrazione/effetto del tossico in esame. È proposto infine un terzo metodo di calcolo, disponibile come programma per personal computer, la cui applicabilità necessita di almeno due risultati parziali.

1. Litchfield e Wilcoxon (metodo semplificato)

Retta concentrazione/effetto

Si tabulano le concentrazioni di sostanza o le percentuali (v/v) di effluente saggiate e le corrispondenti percentuali cumulative di organismi immobilizzati (=100 x n/20). Non si considerano più di due concentrazioni consecutive che hanno causato la completa immobilizzazione (100%) e parimenti non più di due che hanno determinato effetto nullo (0%).
Escludendo gli effetti 0 e 100%, si rappresentano su carta logaritmo-probabilistica le percentuali di organismi immobilizzati in funzione delle concentrazioni corrispondenti. Queste ultime sono riportate sulla scala logaritmica e gli effetti sulla scala delle ordinate. Si traccia la retta che meglio approssima i punti ottenuti, privilegiando quelli compresi fra il 40 e il 60% di effetto. Utilizzando la retta si leggono e si tabulano gli effetti attesi per ciascuna delle concentrazioni saggiate, scartando quelle il cui effetto atteso risulti inferiore a 0,01 o superiore a 99,99. Il grafico viene completato rappresentando anche le concentrazioni che hanno prodotto effetto 0 e 100%. A questo scopo si legge sulla retta tracciata l'effetto atteso per tali concentrazioni e si riporta in grafico il corrispondente valore corretto secondo le indicazioni di Tab. 1.
Se la retta ottenuta risulta insoddisfacente si traccia una nuova retta e si ripetono i passaggi descritti.

Tabella 1: Valori corretti per effetto 0 e 100%. Es.: ad un valore atteso di 98,6% corrisponde un valore corretto di 99,5%

Atteso	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	-	0,3	0,7	1,0	1,3	1,6	2,0	2,3	2,6	2,9
10	3,2	3,5	3,8	4,1	4,4	4,7	4,9	5,2	5,5	5,7
20	6,0	6,2	6,5	6,7	7,0	7,2	7,4	7,6	7,8	8,1
30	8,3	8,4	8,6	8,8	9,0	9,2	9,3	9,4	9,6	9,8
40	9,9	10,0	10,1	10,2	10,3	10,3	10,4	10,4	10,4	10,5
50	-	89,5	89,6	89,6	89,6	89,7	89,7	89,8	89,9	90,0
60	90,1	90,2	90,4	90,5	90,7	90,8	91,0	91,2	91,4	91,6
70	91,7	91,9	92,2	92,4	92,6	92,8	93,0	93,3	93,5	93,8
80	94,0	94,3	94,5	94,8	95,1	95,3	95,6	95,9	96,2	96,5
90	96,8	97,1	97,4	97,7	98,0	98,4	98,7	99,0	99,3	99,7

Test del Chi^2

Si calcolano e si tabulano le differenze tra i valori osservati (o corretti) ed i valori attesi. Mediante il nomogramma di Fig. 1, per ciascuna differenza viene determinato e tabulato il corrispondente contributo al Chi^2. Si sommano poi i singoli contributi e si moltiplica il totale per il numero medio di animali saggiati per concentrazione calcolando a questo scopo, il rapporto fra il numero complessivo di organismi usati per le sole concentrazioni riportate in grafico e il numero delle medesime (=K).

Il dato così ottenuto rappresenta il valore del Chi² della retta in esame. Il numero dei gradi di libertà è dato dal numero di concentrazioni rappresentate in grafico diminuito di due unità (G.L.=K-2). Se il Chi² della retta è inferiore al valore riportato in Tab. 2 per n gradi di libertà, significa che la retta tracciata approssima in modo soddisfacente i risultati sperimentali. In caso contrario si traccia una nuova retta che possa approssimare meglio i dati ottenuti e si ripete l'esame descritto.

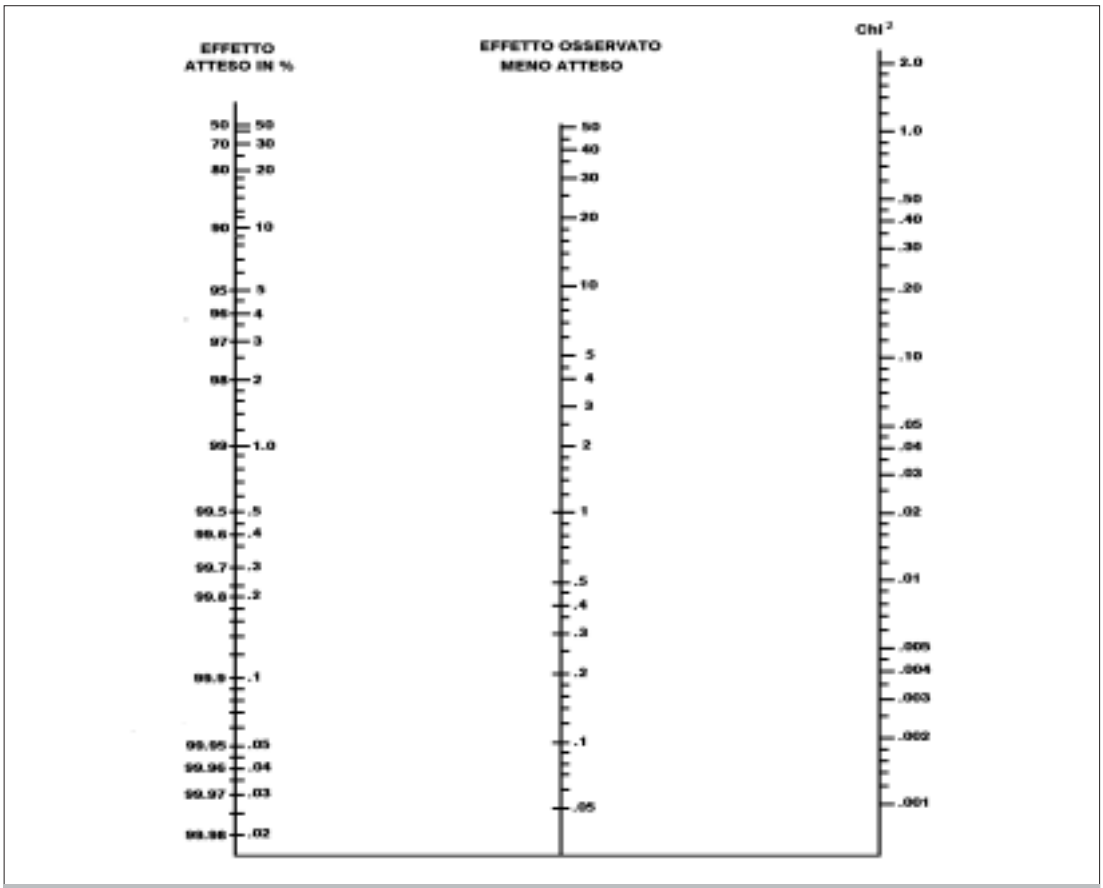


Figura 1: Nomogramma dei contributi al Chi². La retta che congiunge il valore ottenuto dalla differenza tra l'effetto osservato e quello atteso con il corrispondente effetto atteso indica, nel punto di intersezione con la scala del Chi² il contributo cercato

Tabella 2: Valori del Chi² (P= 0,05)

Gradi di libertà (G.L.)	Chi²
1	3,84
2	5,99
3	7,82
4	9,49
5	11,1
6	12,6
7	14,1
8	15,5
9	16,9
10	18,8

EC_{50} e limiti fiduciali

Il valore della EC_{50} (24 o 48h) è letto sulla scala logaritmica del grafico della retta in corrispondenza dell'effetto del 50%.
Mediante il grafico della retta si individuano le concentrazioni pari ad un effetto del 16 e dell'84% (EC_{16}; EC_{84}) e si calcola il valore della funzione S secondo la seguente espressione:

$$S = \frac{\left[\left(\frac{EC_{84}}{EC_{50}}\right) + \left(\frac{EC_{50}}{EC_{16}}\right)\right]}{2}$$

Si determina il valore di N che rappresenta il numero complessivo di organismi saggiati alle concentrazioni il cui effetto atteso è compreso fra 16 e 84% e si procede al calcolo del fattore f mediante la seguente espressione:

$$f_{EC_{50}} = S^{\left(\frac{2{\cdot}77}{\sqrt{N}}\right)}$$

dove S e N hanno il significato già illustrato. I limiti fiduciali della EC_{50} al 95% di probabilità si ottengono come segue:

limite superiore = $EC_{50} \text{ x } f_{EC_{50}}$

limite inferiore = $\frac{EC_{50}}{f_{EC_{50}}}$

2. Media geometrica

Calcolo della EC_{50}

In assenza di risultati parziali la EC_{50} può essere calcolata come segue:

$$EC_{50} = \sqrt{(A \cdot B)}$$

dove A è la massima concentrazione che non ha causato immobilizzazione (effetto 0%) e B è la minima che ha determinato la completa immobilizzazione degli organismi saggiati (effetto 100%).

Limiti fiduciali

Le due concentrazioni A e B rappresentano i limiti fiduciali della EC_{50} con un livello di probabilità che dipende dal numero medio di organismi utilizzato per concentrazione (N). Il livello di probabilità associato ad A e B è calcolato con la seguente espressione:

$$P = 100 \times \left[1 - 2\left(\frac{1}{2}\right)^{N}\right]$$

Con 20 organismi per concentrazione, come previsto dalla presente metodologia di saggio, il livello di probabilità associato ai limiti fiduciali A e B è superiore al 99,99%.

3. Analisi dei "probits"

Questo terzo metodo è proposto come programma per personal computer con sistema operativo DOS versione 3.0 o successiva.
Partendo dai risultati sperimentali, che devono comprendere due effetti intermedi tra 0 e 100%, il programma fornisce la EC_{50} e la EC_1 con i relativi limiti fiduciali più una serie di informazioni sulla retta di regressione "probit" e sull'analisi statistica effettuata.

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "Toxicity test procedure for Daphnia". In: *Standard methods for the examination of water and wastewater*, XX Edition, 8-82, 8-86, (Washington, APHA).

ASTM (1984): "*Standard practice for conducting static acute toxicity test on wastewaters with Daphnia*", American society for Testing and Materials, E 4229-84.

ISO (1982): "*Water quality - Determination of the mobility of Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacca)*", International Organisations of Standardisation, ISO 6341.

MARCHETTI R. & VIGANÒ L. (1991): "Metodi per la determinazione di effeffi tossici acuti con Daphnia magna". In saggio di tossicità con Daphnia, *Quad. Ist. Ric. Acque*, 93, 2.1 - 2.23.

OECD (1984): "*Daphnia sp.*, acute immobilisation test and reproduction test". Guideline n. 202. In: *OECD Guidelines for testing of chemicals*, Effects on biotic systems, ISBN 92-64-12221-4.

PUDDU A. (1989): "Programma di calcolo per l'elaborazione dei risultati di un saggio di tossicità mediante analisi dei Probits", IRSA-Notiziario Metodi Analitici per le Acque, 9 (2), 19-37.

VIGANÒ L. (1991): "Suitability of commercially available spring waters as standard medium for culturing Daphnia magna", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **47**, 775-782.

VIGANÒ L. (1993): "Reproductive strategy of Daphnia magna and toxicity of organic compounds, *Wat. Res.*, **27**, 903-909.

8030. Metodo di valutazione della tossicità acuta con batteri bioluminescenti

Metodo per la determinazione dell'inibizione della bioluminescenza emessa da Vibrio fischeri (già *Photobacterium phosphoreum)*

1. Principio del metodo

Il metodo consente di valutare la tossicità acuta di campioni o estratti provenienti da corpi idrici d'acqua dolce, marina o salmastra utilizzando come risposta l'inibizione della bioluminescenza naturalmente emessa dai batteri marini della specie *Vibrio fischeri*.
La bioluminescenza emessa da una popolazione monospecifica di 10^6 cellule di batteri Gram-negativi appartenenti alla specie *Vibrio fischeri*, ceppo NRRL-B-11177, viene utilizzata per un saggio a 15-30 minuti per la determinazione della EC_{50}, della EC_{20} e della diluizione di non effetto.

2. Campo di applicazione

Il metodo può essere utilizzato per valutare gli effetti tossici acuti di campioni di scarichi afferenti in acque dolci, salmastre, marine o a salinità superiore a quella di mare; di campioni d'acqua superficiale e sotterranea dolce, salmastra, marina o a salinità superiore a quella di mare; di acque destinate al consumo umano; di eluati di fanghi, sedimenti o altri campioni solidi; di estratti di sedimenti e fanghi; di sostanze pure.

3. Interferenze e cause di errore

Sostanze volatili o scarsamente solubili in acqua, composti che possono reagire con l'acqua di diluizione del saggio o che si possono alterare durante le prove, possono influenzare l'attendibilità del risultato ottenuto.
Campioni colorati o torbidi possono interferire con la misura fotometrica della luce emessa dai batteri, invalidandone l'analisi. Per saggiare campioni colorati o torbidi occorre eseguire il saggio seguendo le istruzioni dell'Appendice A.
Un'elevata umidità relativa dell'ambiente di laboratorio in cui è effettuato il saggio può impedire la corretta lettura delle cuvette. In merito seguire le istruzioni del costruttore del luminometro.
La presenza di cloro attivo, utilizzato per la disinfezione delle acque, può interferire con il risultato del saggio diminuendo la vitalità dei batteri. Tale interferenza può essere eliminata procedendo ad una neutralizzazione con tiosolfato (vedi Appendice B).
Valori di pH inferiori a 6 o superiori a 9, così come valori di salinità inferiori a 20‰ o superiori a 50‰ possono influire sulla sopravvivenza dei batteri, inibendone la naturale luminosità.
Nel caso di saggio con campioni d'acqua dolce, il cloruro di sodio utilizzato come correttore osmotico può legare i metalli e/o l'ammoniaca sottraendoli alla biodisponibilità dell'organismo. Per evitare tale effetto può essere utile aggiungere saccarosio al campione ed alle sue diluizioni in modo da raggiungere una concentrazione del 20%, anziché utilizzare il cloruro di sodio. Tale concentrazione di saccarosio riproduce la pressione osmotica minima per la sopravvivenza del batterio. La sostituzione del saccarosio al cloruro sodico è consigliata

quando per la natura stessa del campione (es. scarichi di industrie galvaniche, siderurgiche, meccaniche, elettroniche, chimiche, per la produzione di materie plastiche o catalizzatori, ecc.) o a causa di indagini precedentemente condotte, si sospetti la presenza di elevate concentrazioni di metalli e/o ammoniaca. Il saggio con saccarosio ha solo valore indicativo e non è sostitutivo del saggio con cloruro di sodio. Nel caso che sia usato il saccarosio come correttore osmotico, si rammenti che esso può essere metabolizzato dal *Vibrio fischeri* (Carlson-Ekvall, 1995). L'uso del saccarosio invece del cloruro di sodio deve essere riportato nel rapporto d'analisi.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento deve essere effettuato in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". In particolare, nell'esecuzione di test su acque di scarico il volume di campione necessario per il saggio è di circa 10 mL. Si consiglia per eventuali ripetizioni, di riempire sino all'orlo con il campione d'acqua un contenitore da 100 mL in materiale chimicamente inerte (preferibilmente in vetro scuro). Tale procedura consente di evitare perdite eventuali di sostanze volatili presenti nel campione.
Il campione così prelevato deve essere conservato al buio e alla temperatura di 4°C per non più di 72 ore. Per tempi maggiori si consiglia di congelare il campione a -20°C; in quest'ultimo caso, tuttavia, non è possibile assicurare la totale conservabilità delle caratteristiche chimiche originali del campione ai fini del risultato del saggio tossicologico.

5. Apparecchiature

5.1 *Congelatore* per la conservazione delle colture batteriche a -20°C.

5.2 *Termostato* per mantenere le cuvette del saggio a 15±1°C.

5.3 *Bagno termostatico* per la riattivazione dei batteri secondo istruzioni del produttore.

5.4 *Luminometro* in grado di leggere a 490 nm di lunghezza d'onda con una cella di misura termostatata a 15±1°C.

5.5 *pH-metro*

5.6 *Cronometro*

5.7 *Salinometro* (opzionale)

5.8 *Micropipette* a volume variabile da 10 a 200 µL e da 200 a 5000 µL con adeguati puntali.

Tutti gli accessori destinati a venire in contatto con la sospensione batterica non devono rilasciare sostanze tossiche.

6. Reattivi

6.1 *Organismo test*

Per il saggio viene utilizzato il ceppo NRRL-B-11177 della specie marina *Vibrio fischeri* depositato presso il DSM, Mascheroder Weg 16, 38124 Braunschweig, Germany, o presso l'American Type Culture Collection, 12301 Parkland Drive, Rockville, Maryland, U.S.A. Il batterio può essere coltivato e conservato come descritto in appendice C oppure può essere ac-

quistato come preparato commerciale. In tutti i casi devono essere rispettati, per ciascun lotto di batteri, i seguenti valori di $30minEC_{50}$ relativi a tre composti scelti come riferimento:

Composto	30minEC50 (mg/L)
3,5-diclorofenolo	< 6
$K_2Cr_2O_7$	< 24 (come Cr^{VI})
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	< 28 (come Zn^{II})

Inoltre, il valore di f_{kt} (vedi Capitolo 8) per esposizioni sia a 15 che a 30 minuti deve essere compreso tra 0,7 e 1,4 e i coefficienti di variazione tra le repliche non devono essere superiori al 10%.
Il saggio di ciascun campione deve essere inoltre validato, verificando l'effetto di inibizione della bioluminescenza del 3,5-diclorofenolo.

6.2 Soluzione diluente

Sciogliere 20 g di sodio cloruro in 1 litro di acqua distillata. Aggiustare il pH a 7±0,2 con sodio idrossido (NaOH) 1M o con acido cloridrico (HCl) 1M. È possibile acquistare soluzioni diluenti già preparate per il saggio con batteri bioluminescenti.
Questa soluzione può essere conservata per quattro settimane a 4°C, ma il pH della soluzione deve essere sempre controllato e, se necessario, aggiustato ogni giorno al momento d'uso.

6.3 Soluzione ricostituente

Per i batteri coltivati in laboratorio (vedi Appendice C) utilizzare una soluzione ottenuta sciogliendo sotto agitazione per trenta minuti:

- 8 g di D(+)glucosio monoidrato ($C_6H_{12}O_6 \cdot H_2O$);
- 20 g di NaCl;
- 2,035 g di magnesio cloruro esaidrato ($MgCl_2 \cdot 6H_2O$);
- 0,30 g di potassio cloruro (KCl);

in 1 litro di acqua distillata e portare a pH 7±0,2. Questa soluzione può essere conservata a -20°C per almeno tre mesi.
Per i batteri disponibili commercialmente deve essere garantita una concentrazione salina finale (sotto forma di NaCl) della sospensione del 2%.

7. Procedimento

Prima di condurre il saggio portare il campione a temperatura ambiente, misurare il pH e, nei campioni d'acqua di mare o salmastra, la salinità. Nel caso in cui il valore del pH si collochi al di fuori dell'ambito di sopravvivenza dell'organismo (cfr. par. 3) il saggio va eseguito sia al pH originale del campione, sia a pH 7,0±0,2 previa aggiunta di NaOH e HCl 1M. Nel caso in cui invece, il pH del campione sia compreso tra 6 e 9 unità, non occorre modificare il pH.
Se il campione d'acqua è stato sottoposto a disinfezione, è necessario misurare la quantità di cloro attivo presente (vedi Appendice B).
Nel caso di campioni d'acqua dolce è necessario aggiungere al campione una quantità equivalente di NaCl tale da ottenere una salinità pari al 20‰. Quando necessario (vedi Capitolo 3) il saggio va eseguito utilizzando il saccarosio invece del sale. Per campioni d'acqua di mare, salmastra o a salinità superiore a quella di mare non è necessario alterare la salinità del campione se questa si trova nell'ambito di sopravvivenza dell'organismo (vedi Capitolo 3). Per campioni d'acqua di scarico afferenti in acque di mare, il saggio va condotto alla salinità del corpo recettore.

7.1 Riattivazione della sospensione batterica

Le sospensioni congelate dei batteri, siano esse coltivate in laboratorio o acquistate, devono essere riattivate prima dell'uso, aggiungendo la soluzione ricostituente (6.3). La quantità da aggiungere può variare in considerazione della procedura del saggio, tenendo presente che la quantità di batteri nella cuvetta finale del saggio non deve comunque essere inferiore a 10^6 cellule per cuvetta. Nel caso di batteri provenienti dal commercio, per la riattivazione seguire le istruzioni dei singoli produttori. Dopo la riattivazione è necessario attendere circa 30 minuti, prima di procedere al saggio. La sospensione batterica può essere utilizzata nelle 4-5 ore successive alla riattivazione o, comunque, finchè siano rispettati i valori di f_{kt} riportati in 6.1. Se si conduce il test con una soluzione diluente in saccarosio (Capitolo 3) anche i batteri devono essere riattivati nelle stesse condizioni.

7.2 Conduzione del saggio

Varie procedure di conduzione del saggio possono essere adottate a seconda che sia noto (saggio definitivo) o no (saggio preliminare) l'ambito di concentrazioni entro cui ci si aspetta di rilevare l'effetto tossico dell'acqua o degli estratti da analizzare. Per campioni poco tossici o per corpi idrici superficiali si consiglia invece, di adottare la procedura di saggio al 100%.

7.2.1 Saggio preliminare e definitivo al 100%

Quando sia ignota la tossicità del campione da analizzare occorre procedere preliminarmente saggiando un ampio intervallo di diluizioni. Si consiglia di saggiare, oltre alla soluzione di controllo (si utilizza la soluzione diluente 6.2), il campione tal quale e almeno quattro diluizioni successive 1:10 con la soluzione diluente (6.2), pari al 100%, 10%, 1%, 0,1% e 0,01% del campione. Il saggio è condotto utilizzando una sola cuvetta per diluizione e, quindi, in singolo.
Si preparano le diluizioni nelle cuvette e si incubano le cuvette per circa 15 minuti a 15°C. In altre cuvette, una per ciascuna diluizione, si preparano le sospensioni batteriche riattivate, come descritto in (7.1), in appropriato volume, in modo che la concentrazione massima finale del campione in cuvetta di lettura non sia inferiore all'80%. Per la conduzione del saggio può essere necessario preparare una sospensione batterica più concentrata al fine di ridurre la diluizione del campione da saggiare.
Si lasciano termostatare le cuvette con la sospensione batterica per circa 15 minuti a 15°C e si misura l'intensità luminosa emessa dai batteri per ciascuna cuvetta con il luminometro. Tale misura viene indicata come I_0. Immediatamente dopo la determinazione dell'I_0, si aggiunge il complemento a 1000 µL di campione o di diluizioni di campione o di soluzione controllo alle cuvette contenenti la sospensione batterica. A 15 e 30 minuti dall'aggiunta del campione viene misurata per ciascuna cuvetta l'intensità luminosa emessa dai batteri. I valori ottenuti corrispondono rispettivamente all'I_{15} e all'I_{30} per ciascuna cuvetta. È necessario cronometrare il tempo intercorrente tra l'I_0 e l'I_{15} o l'I_{30} per ciascuna cuvetta in modo da assicurare che sia mantenuto lo stesso tempo di esposizione per ciascuna cuvetta.
Al termine della prova è generalmente possibile individuare un intervallo di concentrazioni entro cui procedere per il successivo saggio definitivo. Generalmente tale intervallo è compreso tra la concentrazione che causa la completa inibizione della luce emessa dal batterio e quella che non inibisce tale emissione.
Lo schema del test definitivo è uguale a quello del preliminare, salvo che l'ambito scandito nel definitivo sarà solamente quello individuato dal test preliminare, e ciascuna diluizione o controllo sarà in multiplo e non più in singolo. Per il test definitivo si consiglia di preparare almeno cinque diluizioni successive (esempio 1:1,5) del campione comprese nell'intervallo in cui era compresa la EC_{50} osservata nel saggio preliminare. Come per il saggio preliminare si misura la luminescenza iniziale I_0 e dopo 15 e 30 minuti rispettivamente la I_{15} e la I_{30} del campione, delle sue diluizioni e della soluzione di controllo. Anche nel saggio definitivo le diluizioni devono essere saggiate insieme alla soluzione di controllo a 15°C di termostatazione.

Per la conduzione del saggio può essere necessario preparare una sospensione batterica più concentrata al fine di ridurre la diluizione del campione da saggiare. Per migliorare la rilevanza statistica del saggio, il numero delle repliche e quello delle diluizioni utilizzate per ciascun campione può essere aumentato a piacere in base alle esigenze dell'operatore. Per lo stesso scopo di attendibilità statistica è opportuno che la ECx rilevata non coincida con i valori estremi della scansione delle diluizioni.
Ove l'operatore esegua un test definitivo con scansione di diluizioni difforme dall'indicazione del test preliminare, dovrà motivare le cause di tale scelta nel rapporto d'analisi.

Nota: *si consiglia di mescolare frequentemente la sospensione batterica prima dell'aggiunta al campione, al fine di ottenere un'omogenea distribuzione dei batteri nelle cuvette.*

7.2.3 Saggio definitivo al 50%

Quando la EC_{50} misurata nel test preliminare è inferiore a 50 o quando sia noto e congruente l'intervallo di tossicità, è possibile condurre il saggio al 50%. Si preparano cinque diluizioni successive (esempio 1:2) del campione in base all'intervallo di tossicità noto (avendo come concentrazione massima del campione il 50%) e si saggiano tali diluizioni a 15°C come nel saggio preliminare in duplicato insieme alla soluzione controllo.
Per migliorare la rilevanza statistica del saggio, il numero delle repliche e quello delle diluizioni utilizzate per ciascun campione può essere aumentato a piacere in base alle esigenze dell'operatore. Per lo stesso scopo di attendibilità statistica è opportuno che la ECx rilevata non coincida con i valori estremi della scansione delle diluizioni.

8. Calcoli

Nell'elaborazione dei risultati occorre calcolare il fattore di correzione dei valori di I_0. Il fattore (f_{kt}) si calcola in base alla risposta della soluzione di controllo come:

$$f_{kt} = \frac{I_{kt}}{I_0}$$

(t = 15 o 30 minuti)

dove I_{kt} è l'intensità luminosa dei batteri misurata dopo l'aggiunta della soluzione di controllo a 15 o 30 minuti, mentre I_0 è l'intensità luminosa prima dell'aggiunta della stessa soluzione. Si calcola la media dei fattori di correzione per le due repliche del controllo e si calcolano per ciascuna cuvetta i valori di I_{ct} (intensità luminosa corretta) nel seguente modo:

$$I_{ct} = I_0 \cdot f_{kt}$$

Per il saggio al 100% e per quello standard l'inibizione percentuale di ciascuna diluizione (H_t) del campione si calcola nel modo seguente:

$$H_t = \frac{I_{ct} - I_{Tt}}{I_{ct}} \cdot 100$$

dove i valori di I_{ct} derivano dalla precedente equazione, mentre quelli di I_{Tt} rappresentano i valori di intensità luminosa a 15 o 30 minuti delle cuvette dopo l'aggiunta del campione e delle sue diluizioni.
Si calcolano le medie delle inibizioni percentuali delle repliche di ciascuna diluizione del campione e i coefficienti di variazione tra le repliche.

8.1 Calcolo della diluizione di non effetto

Il calcolo della diluizione di non effetto viene condotto solamente nel caso di campioni di acque di scarico e comunque non è sostitutivo del calcolo dell'EC_{50}. Il calcolo del G_L è eseguito a partire dai valori di inibizione percentuale misurati a 30 minuti per ciascuna diluizione del campione. Si considera diluizione di non effetto la più elevata tra quelle saggiate che determina una inibizione luminosa inferiore al 20%. Il valore reciproco della diluizione di non effetto rappresenta il valore di G_L per ciascun campione (esempio diluizione 1:4; $G_L = 4$). In accordo con alcune osservazioni dell'OECD (1998) e dell'ISO (2000), si ritiene che le informazioni fornite da questa procedura di calcolo debbano essere progressivamente abbandonate, in quanto non sufficientemente validate dal punto di vista statistico.

8.2 Calcolo di EC_{50} ed EC_{20}

Per il calcolo delle EC_{50} ed EC_{20} occorre trasformare i valori di inibizione percentuale (H_t) in valori gamma (Γ_t) con la seguente equazione:

$$\Gamma_t = \frac{H_t}{100 - H_t}$$

Normalmente vengono utilizzati per le successive elaborazioni soltanto i valori di H_t compresi tra 10 e 90%.
I valori Γ_t così ottenuti vengono messi in relazione con le concentrazioni di campione analizzate (c_t) con la seguente equazione:

$$\log c_t = b \log \Gamma_t + \log a$$

dove *b* rappresenta la pendenza della curva di tossicità e *a* l'intercetta con l'asse delle ordinate.
Con il metodo statistico dei minimi quadrati è possibile calcolare i valori di EC_{20} ed EC_{50} e i relativi limiti di confidenza, che corrispondono a valori di Γ_t pari a 0,25 e 1 rispettivamente.
Il calcolo del EC_{20} è richiesto nei casi in cui non sia possibile determinare il valore di EC_{50}, mentre si definisce non tossico il campione che, saggiato con il test definitivo al 100%, determina alla massima concentrazione considerata un'inibizione inferiore al 20%.
Ove un effetto tossico sia rilevabile solo alle concentrazioni del campione più elevate e non sia quindi possibile calcolare una EC_{20}, il risultato verrà comunque riportato nel rapporto d'analisi ed espresso come percentuale di effetto, indicando anche il numero di repliche effettuate.

9. Qualità del dato

Un esercizio di interconfronto a cui hanno partecipato alcuni laboratori italiani (6 per il sistema MICROTOX e 3 per quello LUMISTox), è stato condotto utilizzando per il saggio due sistemi disponibili commercialmente: il MICROTOX fornito dalla AZUR Environmental (Carlsbad, California, USA) e il LUMISTox fornito dalla Dr Lange (Dusseldorf, Germania).
Sono state utilizzate quali sostanze test il 3,5-diclorofenolo, il bicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$) e il solfato di zinco ($ZnSO_4 \cdot H_2O$). Per ciascuna di queste sostanze è stata determinata l'EC_{50} a 30 minuti utilizzando le seguenti concentrazioni:

	MICROTOX	LUMISTox
3,5-diclorofenolo	10-5-2,5-1,25	10-5-2,5-1,25
$K_2Cr_2O_7$ come Cr^{VI}	20-10-5-2,5	10-5-2,5-1,5
$ZnSO_4 \cdot H_2O$ come Zn^{II}	2,5-1,25-0,62-0,31	40-20-10-5

Ciascuna concentrazione è stata saggiata conducendo da un minimo di tre ad un massimo di sei repliche; mediamente sono state condotte cinque repliche per concentrazione. Ciascuna replica è stata elaborata separatamente al fine di ottenere per ciascun laboratorio un valore medio di EC_{50} a 30 minuti. Il saggio è stato condotto seguendo la metodica qui riportata con alcune variazioni. Per il MICROTOX è stata condotta anche una prova lavando, dopo riattivazione, per tre volte i batteri con la soluzione ricostituente (6.3) e centrifugando la sospensione a 5°C per 30 minuti. Tale operazione è stata condotta per allontanare dalla sospensione batterica residui di mezzo colturale. Per il LUMISTox il test è stato condotto: a) seguendo la metodica DIN 38412 teil 341; b) utilizzando per la riattivazione la soluzione ricostituente (6.3) che a differenza di quella prevista dalla metodica DIN non contiene il tampone organico HEPES; c) utilizzando per la riattivazione una soluzione senza l'HEPES, ma con tampone fosfato così come viene utilizzata per le metodiche AFNOR T90-320 e NVN 6516. È stata infine condotta una prova con i batteri preparati in laboratorio. I risultati ottenuti, sintetizzati in Tab. 1, indicano una precisione, espressa come coefficiente di variazione, compresa tra il 9 e il 30% per il sistema MICROTOX e tra l'11 e il 25% per il sistema LUMISTox.

Tabella 1: Risultati dell'esercizio di intercalibrazione

Lab. totali	Metodica	3,5-diclorofenolo		cromo VI		zinco II	
		media	d.s.	media	d.s.	media	d.s.
5	Microtox	2,63	0,81	19,00	4,8	0,49	0,12
1	Microtox/lavat.	3,45	0,26	13,18	0,56	0,27	0,01
3	Lumistox+hepes	4,52	0,59	4,90	0,43	23,3	4,4
3	Lumistox-hepes	4,37	0,39	4,5	1,25	19,6	2,17
1	Lumistox+tamp.fosf.	4,84	0,60	19,27	0,9	0,62	0,03
1	Lumistox/prep.lab.	3,69	0,11	3,73	0,18	32,28	0,55

BIBLIOGRAFIA

Carlson-Ekvall A.C.E & Morrison G.M. (1995): Contact toxicity of metals in sewage sludge: evaluation of alternatives to sodium chloride in the Microtox® assay. Environmental Toxicology and Chemistry, Vol. 14, n. 1, 17-22.

ISO (2000): *Brief report and resolutions of the 19th meeting of ISO/TC 147/SC5 – Biological methods.* Antalya, Turkey, 59-61.

OECD (1998): "*Report of the OECD Workshop on Statistical Analysis of Aquatic Toxicity Data*", ENV/MC/CHEM(98)18.

APPENDICE A - Test con campioni torbidi o colorati

Per campioni torbidi o colorati (soprattutto di colore rosso, giallo o blu) si rende necessario il controllo della luminescenza emessa dai batteri senza che questi vengano a contatto con il campione. Per fare ciò sono possibili diversi metodi che prevedono la misura, separatamente, dell'emissione di luce e dell'assorbanza per ogni diluizione del campione.
Ciò è possibile utilizzando una cuvetta a doppia camera. Nella camera interna viene posta una quantità nota di soluzione batterica (generalmente 0,2 mL o comunque una quantità tale da riempirla), mentre nella camera esterna si aggiunge la soluzione di controllo (1 mL); si attende 5-10 minuti e si misura la luminescenza emessa dai batteri. Successivamente, nella camera esterna, la soluzione di controllo viene sostituita con il campione da saggiare (1 mL) di cui si misura quindi la luminescenza batterica.
In alternativa è possibile misurare l'assorbanza del campione e delle sue diluizioni mediante uno spettrofotometro regolato a 490 nm e quindi calcolare l'emissione di luce al netto dell'assorbanza.

L'eventuale inibizione misurata permette il calcolo del fattore di correzione da adottare nel calcolo della EC_{50}, della EC_{20} o della diluizione di non effetto. Si considerano significative inibizioni superiori al 10%, mentre inibizioni superiori al 50% normalmente impediscono una corretta elaborazione dei risultati. Per il calcolo del fattore di correzione si rimanda a software di elaborazione dati esistenti in commercio.
Nel caso del saggio preliminare o di quello al 100% il campione viene analizzato alla massima concentrazione stabilita. Nel caso del metodo standard viene analizzata soltanto la concentrazione di campione che si avvicina maggiormente al valore di EC_{50} o di EC_{20} a secondo dell'effetto che si intende considerare.
Nel caso di campioni molto torbidi si consiglia di centrifugare o filtrare il campione prima dell'analisi.

APPENDICE B - Neutralizzazione del cloro attivo totale con tiosolfato

In presenza di cloro libero si può provvedere alla sua determinazione e alla conseguente inattivazione, calcolando i millilitri di una soluzione a titolo noto di tiosolfato pentaidrato da aggiungere ad un volume prestabilito dell'acqua in esame, mediante la seguente equazione:

$$\text{mL di tiosolfato} = \frac{(\text{mL di scarico})\ (F)\ (\text{conc. di } Cl_2)}{(\text{conc. di tiosolfato})}$$

dove:

mL di tiosolfato = mL della soluzione a titolo noto da aggiungere all'acqua di scarico;
F = 6,7 per il tiosolfato anidro e 10,52 per quello pentaidrato;
conc. di Cl_2 = concentrazione del cloro attivo totale presente nell'acqua di scarico espressa in mg/L;
conc. di tiosolfato = concentrazione di tiosolfato espressa in mg/L.

Il titolo del tiosolfato deve essere controllato ogni 15 giorni.

APPENDICE C - Metodo per la coltura di batteri bioluminescenti in laboratorio

Strumentazione richiesta oltre a quella già prevista dal saggio:

- autoclave per sterilizzazione vetreria e mezzi di coltura;
- centrifuga refrigerata;
- agitatore magnetico;
- incubatore ad agitazione continua;
- fotometro o spettrofotometro per misure a 578 nm di lunghezza d'onda.

Per la coltura dei batteri utilizzati nel test, distribuire 0,1 mL di una sospensione di 10^6 cellule del ceppo *Vibrio fischeri* NRRL-B-11177 sulla superficie di una piastra Petri sterile contenente il terreno solido (C.2). Spatolare il terreno e incubare la piastra a 20°C per 2-5 giorni. Dopo la crescita delle colonie, osservare la piastra al buio e contrassegnare le colonie luminescenti. Trasferire ciascuna colonia contrassegnata su una nuova piastra di terreno solido e strisciare. Incubare come sopra descritto e isolare nuovamente le colonie luminescenti. Tale procedura di isolamento si rende necessaria in quanto la sospensione di partenza potrebbe essere stata confezionata in condizioni di non sterilità.
Inoculare quindi in condizioni di sterilità una singola colonia isolata in 50 mL di terreno liquido (C.1) (coltura primaria). Incubare sotto agitazione, (preferibilmente con agitatore magnetico) a 20±1°C per 20±1 ore a 180 rpm. Al termine del periodo di incubazione prelevare in sterilità 1 mL di soluzione colturale e diluirla con 9 mL di soluzione di cloruro di sodio

20 g/L in acqua distillata e misurare la torbidità in FAU a 578 nm secondo la norma ISO 7027-1984 (vedi Capitolo 4).
Inoculare quindi in 50 mL di terreno liquido un volume di coltura primaria tale che la torbidità iniziale sia pari a 10 FAU. Incubare sotto agitazione a 20±1°C per 20±1 ore. Al termine del periodo di incubazione misurare la torbidità della coltura diluita 1/10. Il valore atteso dovrebbe essere compreso tra 700 e 1800 FAU per la coltura non diluita.
Porre quindi in un bagno freddo una soluzione di cloruro di sodio al 2% in acqua distillata e il mezzo di conservazione (vedi Capitolo 3). Centrifugare il brodo di coltura a 4±1°C per 15-20 minuti a 6000±2000 G. Decantare il surnatante e riprendere il residuo con 5-10 mL della soluzione di cloruro di sodio fredda. Centrifugare come sopra. Decantare il surnatante, risospendere il residuo con 0,5 mL della soluzione di cloruro di sodio, trasferire la sospensione in un beaker freddo da 100 mL e porre in bagno freddo. Aggiungere lentamente, agitando, 4 mL di mezzo di conservazione (vedi Capitolo 3). Diluire 1/100 una aliquota di 100 µL e misurare la torbidità come precedentemente descritto. Aggiungere un volume di mezzo di conservazione tale che la torbidità definitiva prevista sia compresa tra 2000 e 3000 FAU. Il volume complessivo di mezzo di conservazione da aggiungere non deve, comunque, essere inferiore a 5 mL.
Mantenere la sospensione in bagno freddo ancora per 15 minuti. Distribuire aliquote di 100 µL in provette munite di tappo. Congelare a -20 o a -80°C.
La stabilità dei batteri preparati è di almeno un mese a -20°C e di sei mesi a -80°C.
Per evitare alterazioni genetiche del ceppo è bene preparare nuove colture ogni sei mesi.

C.1 - Terreno liquido

Il terreno liquido si prepara sciogliendo in acqua distillata:

- 30 g di NaCl;
- 6,1 g di fosfato monosodico monoidrato ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$);
- 2,75 g di fosfato bipotassico triidrato ($K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$);
- 0,204 g di magnesio solfato eptaidrato ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$);
- 0,5 g di fosfato biammonico ($(NH_4)_2HPO_4$);
- 3 mL di glicerolo;
- 5 g peptone di caseina;
- 0,5 g di estratto di lievito.

Si porta la soluzione ad 1 litro con acqua distillata e si aggiusta il pH a 7,2±0,2 con NaOH 1 M o HCl 1 M.
Si suddivide la soluzione in aliquote da 50 mL in beute da 250 mL e si sterilizza in autoclave a 121°C per 20 minuti.

C.2 - Terreno solido

Il terreno solido si prepara impiegando la stessa soluzione del terreno liquido allo stesso pH, aggiungendo a freddo 12 g di agar per litro. Questo terreno poi va sciolto a caldo, autoclavato e distribuito su piastre Petri sterili.

C.3 - Mezzo di conservazione

Il mezzo si prepara sciogliendo a 37°C in agitazione:

- 60 g di D(+)-glucosio ($C_6H_{12}O_6$);
- 4 g di cloruro di sodio (NaCl);
- 2 g di L-istidina;
- 0,5 g di sieroalbumina (BSA).

Se necessario, si aggiusta la soluzione a pH 7,2±0,2 con NaOH 1 M o HCl 1 M e si porta a

100 mL con acqua distillata. La soluzione non può essere conservata, per cui si consiglia di prepararla fresca ogni volta prima dell'uso.

C.4 - Determinazione fotometrica della torbidità (norma ISO 7027-1984)

Apparecchiatura: fotometro e spettrofotometro per misure a 578 nm.

Reattivi: soluzione A - esametilentetrammina 10 g/100 mL di acqua distillata;
soluzione B - idrazina solfato 1 g/100 mL in acqua distillata.

Metodo: in un matraccio tarato da 100 mL unire 5 mL di soluzione A con 5 mL di soluzione B. Lasciare per 24 ore a temperatura ambiente e portare a volume con acqua. La torbidità della sospensione di formazina così preparata è di 400 unità di attenuazione-formazina (FAU). Diluire opportunamente in acqua tale standard in modo da ottenere sospensioni il cui valore di torbidità sia 10 FAU, 50 FAU, 100 FAU e 200 FAU. Misurare l'assorbanza di ciascuna soluzione a 578 nm e tracciare una curva di taratura da utilizzare per le misure di torbidità della sospensione batterica.

8040. Metodo di valutazione della tossicità acuta con *Ceriodaphnia dubia*

1. Introduzione

Il metodo descrive la procedura con la quale indagare se effluenti di scarico o acque superficiali contengono inquinanti a concentrazioni tali da causare effetti tossici acuti sul crostaceo d'acqua dolce *Ceriodaphnia dubia.* La mancata osservazione di effetti tossici acuti per un dato campione non esclude che essi si manifestino saggiando campioni prelevati in altri momenti, e ciò in dipendenza della variabilità dello scarico o del corpo idrico superficiale. Si tenga presente, inoltre, che l'assenza degli effetti tossici che si manifestano a breve termine (acuti) non preclude che lo stesso corpo idrico o lo stesso effluente di scarico possano causare quegli effetti tossici che si manifestano invece solo dopo esposizione prolungata (cronici).

2. Generalità sul metodo

In questo tipo di saggio giovani individui di *Ceriodaphnia dubia* sono esposti per un tempo massimo di 48 ore (eventualmente prolungabile a 96 ore) a campioni dei quali si voglia misurare la tossicità acuta. Generalmente, un campione di acqua di scarico è saggiato ad almeno 5 diluizioni, a ciascuna delle quali è esposto un numero definito di giovani organismi. Elaborando i dati di mortalità osservati alle diverse diluizioni, è possibile ottenere per un dato campione il valore di diluizione letale per il 50 % degli individui (LC_{50}) al tempo di esposizione prescelto. Una procedura analoga è applicabile allo studio degli effetti tossici acuti delle acque dei corpi idrici; tuttavia è raro che in questo caso le concentrazioni degli inquinanti raggiungano livelli tali da permettere l'osservazione di effetti superiori al 50% di mortalità. Molto più spesso l'esame di un corpo idrico si limita a valutare la significatività statistica di pochi eventuali decessi osservati per esposizione di *C. dubia* ad un campione non diluito.
Si tenga presente che il metodo basato sull'uso di questo stesso crostaceo per la stima della tossicità cronica (7 giorni), può consentire anche la valutazione della tossicità acuta, a patto che le diluizioni del campione da saggiare coprano un intervallo di valori sufficientemente ampio. Si raccomanda, di conseguenza, di privilegiare l'applicazione del saggio a 7 giorni ogni qual volta sia possibile.
Nel caso si voglia esaminare la relazione esistente tra la tossicità acuta e quella cronica di un effluente o di un corpo idrico, i due dati di tossicità dovranno essere prodotti nelle stesse condizioni sperimentali e cioè, quelle del saggio cronico (7 giorni).

3. Conduzione del saggio

3.1 Materiali e strumentazione

La conduzione del saggio di tossicità richiede:

- almeno 12 contenitori del tipo beaker in vetro borosilicato con volume utile di 30 mL. Numerosi laboratori usano con successo dei contenitori "a perdere", in polistirene, che sono normalmente commercializzati per alimenti;
- sistema di lampade fluorescenti ad ampio spettro con un temporizzatore per il controllo del fotoperiodo e possibilmente un dispositivo che simuli la transizione graduale tra le fasi di luce e di buio;

- dispositivo per il controllo della temperatura delle diluizioni da saggiare nell'ambito di 20±1°C e 25±1°C per tutta la durata della sperimentazione;
- analizzatore di ossigeno disciolto con sensore dl dimensioni adeguate alla misura nei contenitori di saggio;
- microscopio binoculare da dissezione, provvisto dl illuminazione laterale;
- fonte di aria compressa a bassa pressione, con cannule in vetro o pipette Pasteur per far gorgogliare l'aria nelle soluzioni da aerare. L'applicazione di un piccolo compressore del tipo usato in acquariologia può costituire una soluzione adeguata. L'aria distribuita dai grossi impianti centralizzati è spesso contaminata da vapori di oli o altri inquinanti che vanno rimossi con opportuni dispositivi di filtrazione.

3.2 Organismi per il saggio

La specie utilizzata in questo saggio di tossicità è il crostaceo cladocero *Ceriodaphnia dubia*, che è allevato in laboratorio seguendo le indicazioni fornite in Appendice A2. Il saggio è allestito con neonati appartenenti alla terza schiusa o alle successive, prodotte da femmine mantenute in condizioni di allevamento controllate e rispondenti ai requisiti di buone condizioni colturali descritti in Appendice. I giovani organismi da utilizzare sono quelli schiusi entro e non oltre le 24 ore precedenti l'allestimento della prova.

3.3 Acqua di diluizione

Generalmente, le diverse diluizioni del campione da saggiare sono preparate usando come acqua di diluizione e di controllo la stessa in cui sono allevati gli organismi riproduttori. Tuttavia, in funzione delle finalità del saggio è opportuno distinguere tra diverse possibili soluzioni:

a) Se lo scopo è di evidenziare la presenza di effetti tossici acuti e il loro andamento nel tempo o di confrontare la tossicità di diversi effluenti, corre diluente si adotterà un'acqua sintetica (standard) avente durezza di circa 150 mg/L $CaCO_3$, per la cui preparazione si aggiungono dei sali di grado analitico ad acqua ultrapura o deionizzata di qualità equivalente.

Per preparare 1 L di acqua standard, i sali ed i quantitativi da aggiungere sono, nell'ordine, i seguenti:

10 mg di KCl, 192 mg di $NaHCO_3$, 53 mg di $MgSO_4$ e 183 mg di $CaSO_4 \cdot 2H_2O$. La soluzione risultante ha durezza compresa tra 140 e 160 mg $CaCO_3$/L, alcalinità 110-120 mg $CaCO_3$/L, e pH 7,5-6,5. L'acqua standard può anche essere preparata a partire da un'acqua minerale, scelta tra quelle disponibili in commercio, preferibilmente la stessa eventualmente usata per allevare l'organismo e adeguata, se necessario, nelle concentrazioni di alcuni costituenti maggiori per dare i valori di durezza e alcalinità indicati (vedi Appendice A3).

b) Se lo scopo del saggio è di valutare la tossicità acuta determinata dall'immissione di uno scarico nelle acque del recettore, come diluente si userà l'acqua non contaminata di quest'ultimo prelevata a monte dell'immissione o comunque al di fuori dell'area esposta a fonti di contaminazione. Nel caso essa non sia disponibile, si può utilizzare un'acqua prelevata da un altro corpo idrico superficiale o un'acqua sintetica (vedi "punto a") avente approssimativamente le stesse caratteristiche chimiche e, in particolare, lo stessa durezza del corpo idrico recettore oggetto del controllo. In qualche caso è anche possibile operare modificando la composizione di un'acqua naturale, purchè di qualità adeguata, previa aggiunta di sali (reagenti di grado analitico) nelle quantità necessarie. Il prelievo di acque naturali deve essere effettuato immediatamente prima del loro impiego e comunque non oltre le 96 ore dallo stesso, mantenendo refrigerati i campioni (4°C) quando se ne faccia uso a più di 24 ore dalla raccolta.

c) Se lo scopo del saggio è quello di esaminare gli eventuali effetti additivi o comunque le in-

terazioni tra i contaminanti presenti nello scarico e quelli veicolati dal recettore, come acqua di diluizione si userà quella del recettore stesso, indipendentemente dal suo grado di contaminazione, prelevata a monte o al di fuori dell'influenza dello scarico in esame. In questo caso è necessario aggiungere un gruppo di organismi di controllo esposti alla sola acqua di allevamento (vedi Appendice A3).

3.4 Illuminazione

Gli organismi esposti ai campioni di acque da saggiare sono mantenuti nelle stesse condizioni di illuminazione in cui sono allevati. La sorgente luminosa è costituita da un sistema di lampade fluorescenti ad ampio spettro (Indice di resa cromatica ≥ 90), il fotoperiodo è di 16 ore di luce e 8 di buio. Un'intensità luminosa che al piano di lavoro sia compresa tra 500 e 1000 lux si è generalmente dimostrata adeguata.

3.5 Temperatura

il campione da saggiare o le sue diluizioni sono mantenute per tutta la durata della sperimentazione a 20±1°C. Se invece, i risultati ottenuti dal saggio acuto dovranno essere esaminati in relazione a dati di tossicità cronica prodotti con lo stesso organismo, la tossicità acuta del campione deve essere misurata a 25±1°C, e cioè alla temperatura prevista per la conduzione del saggio cronico. Per entrambi i valori di temperatura il risultato è conseguibile immergendo i contenitori del saggio in un bagno termostatato o condizionando la temperatura dell'intero ambiente in cui è condotto il lavoro sperimentale.

3.6 Alimentazione

In generale i giovani individui di C. *dubia* non vengono nutriti durante la prova. Tuttavia, se essi non sono utilizzati entro 2-3 ore dall'isolamento dai recipienti in cui si sono schiusi, può essere suggerita la somministrazione di cibo fino al loro trasferimento nelle soluzioni test, nei quantitativi indicati per l'allevamento del cladocero (vedi Appendice A4). Similmente, se si intende prolungare il saggio fino a 96 ore di esposizione (20±1°C), circa 2 ore prima del rinnovo delle soluzioni e quindi del trasferimento degli organismi (vedi Capitolo 4) si somministra la stessa dieta usata per le colture. Il rinnovo è solitamente effettuato allo scadere delle 48 ore di saggio.

3.7 Ossigeno disciolto

Raggiunta la temperatura prevista per il saggio, è necessario misurare la concentrazione di ossigeno disciolto nel campione destinato alla prova. Se tale concentrazione risulta prossima o inferiore al 40% del valore di saturazione, è necessario aerare l'aliquota del campione da saggiare. L'aerazione deve essere moderata in modo da minimizzare i cambiamenti del campione, quali ad esempio quelli relativi al valore di pH, al contenuto di sostanze facilmente ossidabili o volatili. L'importanza e la necessità di intervenire prima dell'allestimento della prova, è dovuta al fatto che successivamente sarebbe pressoché impossibile aerare i piccoli volumi delle soluzioni di saggio senza arrecare disturbo agli organismi. Se tuttavia, durante il saggio si osserva che il consumo di ossigeno è tale da rischiare di invalidare la prova, si può intervenire con rinnovi più frequenti delle soluzioni, ricorrendo a nuove aliquote di campione preventivamente aerato. Considerazioni analoghe valgono anche per i trattamenti di controllo.

4 Procedura di saggio con diluizione (effluente)

4.1 Saggio preliminare

Generalmente, la misura degli effetti tossici acuti di un effluente o di un corso d'acqua, è effettuata senza acquisire dei dati preliminari sulla loro tossicità. In taluni casi, quando ad

esempio si sospetta che un campione sia molto tossico, può essere vantaggioso disporre di informazioni preliminari per meglio impostare i saggi tossicologici definitivi.
In queste eventualità si allestisce una prova preliminare semplificata e di durata inferiore a quella definitiva. Si preparano 5 diluizioni del campione, del volume di 20 mL ciascuna, scelte in modo da coprire un ampio intervallo di concentrazioni. La sequenza 100%, 10%, 1%, 0,1% e 0,01% (v/v) può essere adottata a questo scopo. In ogni contenitore sono introdotti 6 neonati di *C. dubia* e dopo un massimo di 24 ore si registrano i risultati. Se il campione della prova preliminare dovrà essere saggiato anche nella prova definitiva, si raccomanda di procedere nel rispetto dei limiti di conservabilità del campione stesso. Se viceversa le due prove sono condotte con campioni prelevati in momenti diversi, si tenga presente che, a causa della variabilità più o meno accentuata della tossicità dello scarico o del recettore, i risultati del saggio preliminare e di quello definitivo possono anche essere molto diversi.

4.2 Saggio definitivo

Per la conduzione del saggio definitivo, è necessario preparare almeno 5 diluizioni del campione in esame. Una serie che si è dimostrata applicabile a gran parte delle situazioni è la seguente: 100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25 % (v/v). I valori sono in serie geometrica secondo un fattore di diluizione pari a 0,5. In casi particolari, come quelli individuati da un eventuale saggio preliminare, si possono adottare altre sequenze con un diverso fattore di diluizione o anche un maggiore numero di diluizioni.
Se è stato necessario refrigerare i campioni, le aliquote destinate al saggio sono prelevate dopo accurato mescolamento e portate alla temperatura scelta per la prova. Si procede quindi alla misurazione della concentrazione di O_2 disciolto, in accordo alle indicazioni date in precedenza (vedi Paragrafo 3.7). Solo quando le 5 o più diluizioni hanno raggiunto le condizioni indicate per il test, vengono immessi gli organismi. Analoga procedura vale per il gruppo degli organismi di controllo.
Nei saggi di tossicità acuta l'allestimento di più repliche per ogni concentrazione risponde prevalentemente a necessità di tipo pratico; infatti, i singoli risultati che esse forniscono sono, solitamente, combinati in un unico dato riferito al corrispondente valore di concentrazione. Questa consuetudine rende pressochè inutile l'allestimento di più repliche, a meno che non vengano utilizzati più organismi di quanti ne sono previsti nello schema di base qui proposto. In accordo con quest'ultimo per ogni diluizione di effluente o di acqua del recettore si utilizzano almeno 10 neonati di *C. dubia* di età ≤24 ore, in soluzioni di volume pari a 20 mL.
Per il trasferimento si utilizza una pipetta di vetro provvista di bulbo in lattice per aspirazione e con diametro interno di almeno un paio di mm, avendo cura di premere il bulbo per immettere gli organismi nel nuovo recipiente solo quando l'estremità della pipetta è sotto la superficie del liquido. Per evitare una diluizione significativa delle soluzioni di saggio, si raccomanda di limitare al minimo il volume di acqua trasferito con gli animali.
L'eventuale prosecuzione della prova fino a 96 ore, richiede che le soluzioni del saggio siano rinnovate almeno una volta e allo scadere delle 48 ore. In base ai criteri già enunciati, si può anche decidere di aumentare la frequenza di rinnovo delle soluzioni e in ogni caso le soluzioni fresche sono preparate rispettando la stessa procedura descritta per allestimento del saggio. Allo scadere delle 48 ore o comunque al momento del rinnovo, i giovani individui di ceriodafnia sono trasferiti nelle diluizioni corrispondenti a quelle cui sono già stati esposti. Giornalmente e a intervalli di esposizione costanti (24 ore, 48 ore, ecc.) si ispezionano i contenitori di saggio con l'aiuto di un microscopio binoculare, al fine di registrare e rimuovere gli eventuali organismi deceduti.
Gli esemplari sopravvissuti alla prova tossicologica, inclusi gli organismi di controllo, non potranno essere riutilizzati.

5. Procedura di saggio senza diluizione (corpo idrico)

5.1 Saggio definitivo

Per determinare se un corpo idrico contiene tossici capaci di determinare effetti acuti su *C. dubia,* si espongono i neonati di questo crostaceo ad un campione non diluito delle acque dello stesso. Se le caratteristiche di quest'ultimo, almeno in termini di durezza, sono sostanzialmente diverse da quelle dell'acqua di allevamento, è necessario utilizzare neonati prodotti da femmine acclimatate in un mezzo avente durezza simile a quella del campione da saggiare (vedi Paragrafo 3.3 e Appendice A3). In tal caso, la prova di controllo è allestita usando l'acqua di acclimatazione.
Il campione del corpo idrico viene saggiato in quattro repliche e in modo analogo viene allestita la prova di controllo. In ciascuna delle repliche, aventi volume di 20 mL, sono introdotti 10 neonati di *C. dubia.* Contrariamente alla procedura dei saggi con diluizione, in questo caso i risultati delle diverse repliche non vengono cumulati bensì utilizzati per valutare se le eventuali differenze di sopravvivenza (o di mortalità) tra gli organismi esposti al campione e quelli esposti al mezzo di controllo, sono statisticamente significative. Per quanto riguarda le restanti condizioni di saggio esse sono da considerarsi invariate rispetto a quanto già descritto.
Se la tossicità del corpo idrico risultasse tale da causare una mortalità degli organismi superiore al 50%, si può procedere alla misura della tossicità acuta in termini di LC_{50}. In questo caso la procedura da seguire è quella descritta per il saggio con diluizione (vedi Capitolo 4).

6. Validità del saggio

I risultati dei saggi sono giudicati accettabili se al termine del periodo di esposizione la sopravvivenza degli organismi di controllo è ≥90% e se la concentrazione di ossigeno disciolto si è mantenuta ≥40% del valore di saturazione.
Pur senza imporre altri vincoli alla validità del saggio, è consigliabile la conduzione periodica di test in condizioni standard con un tossico di riferimento, quale ad esempio il bicromato di potassio o il pentaclorofenolo. Questa pratica fa sì che sia disponibile un'ampia serie di valori di LC_{50} del tossico prescelto rispetto alla quale dovrebbe essere possibile evidenziare delle condizioni sperimentali o lotti di organismi anomali. In condizioni normali, il risultato di ogni nuovo saggio di riferimento dovrebbe collocarsi entro l'intervallo definito dal valore medio delle precedenti LC_{50} e dal doppio del loro scarto tipo (media ± 2·scarto tipo). Viceversa, se la LC_{50} del tossico di riferimento si colloca all'esterno di questo intervallo di sicurezza, tutti i dati ottenuti con il medesimo lotto di organismi e in quel periodo sperimentale dovrebbero essere considerati con cautela.
A scopo informativo, vengono riportati alcuni dati di letteratura relativi al saggio acuto con *C. dubia.* Una serie di 7 prove condotte da un unico laboratorio sullo scarico di un impianto di depurazione civile diede un valore medio della $48hLC_{50}$ di 26,1% (v/v) con un coefficiente di variazione del 25,5% (Rue et al., 1988). Una serie analoga di 15 saggi diede un valore medio di $48hLC_{50}$ pari al 60,0% (v/v) con un CV del 31,1%. Il confronto tra il saggio acuto con *C. dubia* e quello con il ciprinide *Pimephales promelas*, condotti in parallelo sui medesimi campioni di acqua di scarico, fornì una $48hLC_{50}$ media di 78,4% per il crostaceo e di 75,8% per il pesce, con CV, rispettivamente, di 33,1 e 19,6% (Norberg-Ring, 1989, memorandum).
Il saggio acuto con *C. dubia è* stata oggetto di due studi di intercalibrazione entrambi con lo stesso tossico di riferimento, il KCl (25°C, durezza 50-100 mg/L $CaCO_3$). Al primo studio parteciparono 11 laboratori e risultò una $48hLC_{50}$ media di 264 mg KCl/L con un CV del 48,5%. Al secondo studio parteciparono 171 laboratori consentendo la valutazione di una $48hLC_{50}$ media di 432 mg KCl/L e di un CV pari a 39,8%.

7. Analisi dei risultati

7.1 Calcolo della LC_{50}

Il saggio per la valutazione della tossicità acuta, descritto in questa procedura, si propone non solo l'identificazione delle sorgenti di contaminazione capaci di provocare effetti tossici acuti, ma anche la quantificazione della loro potenziale tossicità mediante la stima della concentrazione letale per il 50% degli organismi (LC_{50}), per un dato tempo di esposizione (24-48 h). La determinazione della LC_{50} può essere effettuata con diversi metodi la cui applicabilità è in buona parte dipendente dal tipo di risultati ottenuti e, più precisamente, dal numero di effetti parziali osservati, intermedi cioè, tra una mortalità del 100% e una mortalità nulla. La valutazione della LC_{50} dovrebbe basarsi sui risultati relativi ad almeno 5 concentrazioni di campione ed un controllo, sebbene molti metodi di analisi possono essere utilizzati con un numero di dati inferiore. Se la massima concentrazione saggiata ha causato una mortalità inferiore al 50%, non si dovrebbe procedere al calcolo della LC_{50}, il cui valore sarebbe in tal caso poco attendibile. Meglio ripetere il seggio, se possibile, cercando di migliorare la serie delle concentrazioni saggiate. In caso contrario la LC_{50} sarà più correttamente espressa come "maggiore della massima concentrazione sperimentata" (es.: $48hLC_{50} > 80\%$).
Nel metodo di saggio dedicato alla valutazione della tossicità acuta con *Daphnia magna* (metodo 8020) sono stati proposti tre diversi metodi, ampiamente validati, atti alla valutazione della LC_{50}. Si tratta del metodo di Litchfield e Wilcoxon, del test binomiale e del metodo probit. Essi sono adeguatamente illustrati nell'ambito della Sezione 8020 al quale si rinvia. Infine, è opportuno segnalare che sono disponibili in commercio alcuni programmi per personal computer espressamente dedicati ai metodi di analisi statistica dei risultati tossicologici. A questi prodotti si rinvia.

7.2. Effetti da concentrazione unica

L'esame dei risultati ottenuti saggiando un campione non diluito del corpo idrico è riconducibile alla teoria del confronto tra due campioni. Nel presente schema sperimentale, i decessi osservati nelle repliche del corpo idrico e in quelle del controllo rappresentano le due serie di dati posti a confronto.
Di fatto, se la mortalità degli organismi esposti al corpo idrico supera il valore del 10%, e cioè quel limite di decessi accettato come "naturale" in un gruppo di individui di controllo, si può già concludere che il campione contiene inquinanti a concentrazioni tossiche. Tuttavia può essere opportuno dare supporto statistico al risultato del saggio, verificando la cosiddetta ipotesi nulla o zero, e cioè che le medie dei decessi osservati nei due trattamenti siano uguali. Smentire l'ipotesi con un certo grado di probabilità, solitamente P=0,05, equivale a verificare che la mortalità osservata per gli organismi esposti al corpo idrico è significativa.
Il test "*t*" utilizzato per confrontare i due campioni e, dal momento che vi è un'attesa di contaminazione o di mortalità maggiore per il campione del corpo idrico piuttosto che per il controllo, un test unilaterale è generalmente adeguato. L'applicazione del test "*t*" richiede che le proporzioni di decessi osservati nelle repliche siano distribuite normalmente. Se i dati soddisfano questo requisito è necessario procedere anche alla verifica di omogeneità della varianza dei due gruppi di risultati e solo in caso affermativo è lecito passare all'esame della significatività dei decessi osservati. Se i dati non fossero distribuiti normalmente il problema viene comunemente risolto mediante opportune trasformazioni dei dati stessi. La conversione delle proporzioni di organismi deceduti nella radice quadrata del loro arc sen è la trasformazione più comune. Se non si rivelasse risolutiva è necessario procedere all'esame dei risultati con metodi non parametrici. Se a sua volta, la condizione di omogeneità della varianza non fosse rispettata, il test "*t*" rimane valido ma deve essere applicato in forma modificata. Il valore calcolato per la funzione "*t*" è infine confrontato con il valore critico di "*t*" individuabile in apposite tabelle, in base al numero di gradi di libertà ed al livello di probabilità prescelto. Se il valore di "*t*" calcolato supera il valore tabellare, le due mortalità sono significativamente diverse. Sono disponibili in commercio dei programmi per personal computer che sono espressamente dedicati all'analisi statistica dei risultati tossicologici e possono svolgere tutte le operazioni necessarie. A questi prodotti, pertanto, si rinvia.

APPENDICE

A1 - Note sulla sistematica e sulla biologia di *Ceriodaphnia dubia*

I Crostacei Cladoceri sono organismi di piccole dimensioni, in larga parte planctonici, che popolano prevalentemente le acque dolci. In particolare, le specie appartenenti alla famiglia Daphnidae sono ubiquitarie delle acque dolci della fascia temperata e a questa famiglia appartengono tre specie che rivestono grande interesse per gli studi tossicologici, e cioè *Daphnia magna*, *Daphnia pulex* e *Ceriodaphnia dubia*. Quest'ultima, relativamente a tali studi, è quella di più recente acquisizione (Mount e Norberg, 1984).
Caratteristiche generali dei Cladoceri sono la compressione laterale del corpo, il carapace bivalve che racchiude il tronco, l'unico grande occhio composto, la presenza di antennule e di antenne, le prime immobili con papille olfattorie e setole sensoriali e le seconde con funzione natatoria, molto sviluppate. Il postaddome, che è una formazione esclusiva dei Cladoceri, ha ornamentazioni aventi valore tassonomico.
In *Ceriodaphnia*, come in generale nei Cladoceri, i sessi sono separati e con un evidente dimorfismo. In Fig. 1A è illustrato l'aspetto di una femmina partenogenetica di *C. dubia*. Essa è caratterizzata da un corpo ovale molto allargato, lungo da 0,95-1,4 mm (Margaritora, 1933). Il secondo paio di antenne è provvisto di 9 setole natatorie. Il capo è allungato e compresso nettamente distinto, tramite un seno cervicale, dal carapace. Quest'ultimo, che è provvisto di una reticolatura poligonale molto evidente, termina dorsalmente con un angolo aguzzo e una corta spina, appena pronunciata. L'individuo di sesso maschile, illustrato in Fig. 1C, ha dimensioni di poco inferiori e forma più slanciata, meno tondeggiante. Le sue antennule sono allungate con un flagello terminale molto sviluppato. Altrettanto vale per il primo paio di appendici toraciche la cui forma è finalizzata all'accoppiamento. Sia nella femmina che nel maschio, l'artiglio terminale del postaddome presenta un pettine finemente setoloso (Fig. 2).
La presenza di *C. dubia è* stata documentata nella fascia litorale dei laghi, nei piccoli bacini e nelle raccolte d'acqua temporanee praticamente di tutto il mondo. È diffusa negli stessi distretti di una specie molto simile, nota come *C. reticulata*, anche se rispetto a questa è decisamente più rara. È presente sul territorio nazionale dove è stata rinvenuta in Istria, nel tratto inferiore del Po, in Abruzzo e in Sicilia (Margaritora, 1983) anche se spesso è stata citata col sinonimo di *C. affinis*.
Durante gran parte dell'anno, la popolazione di *C. dubia* consiste pressoché esclusivamente di individui di sesso femminile che si riproducono con uova partenogenetiche. Queste sono deposte nella camera dorsale di incubazione (Fig. 1B), in numero da 4 a 10 o più. Schiuse anche di 20 neonati non sono infrequenti.

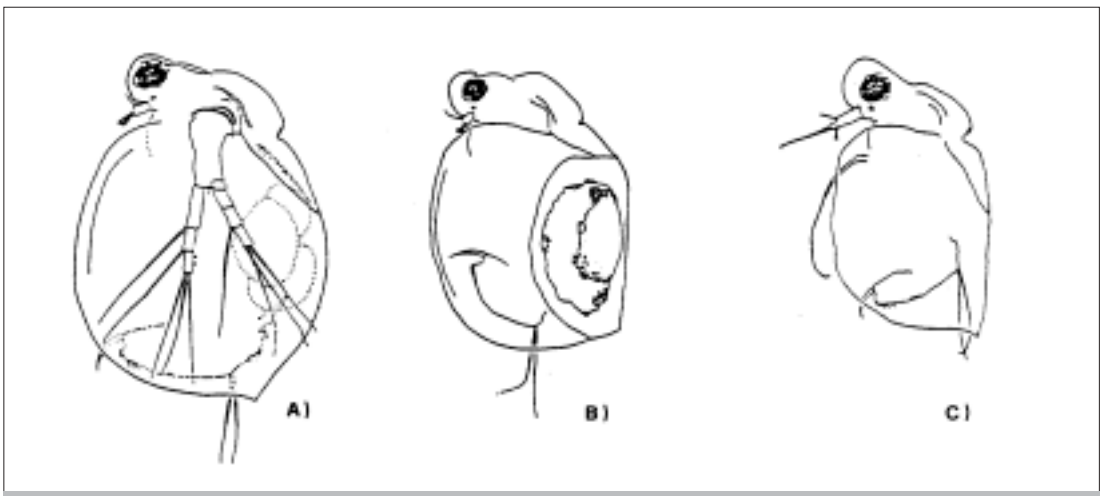


Figura 1: Ceriodaphnia dubia:
A) femmina in attività riproduttiva partenogenetica; B) femmina con efippio; C) maschio (modificata da Berner, 1986)

I giovani individui sono pressoché identici agli adulti e pertanto si accrescono senza un vero processo di metamorfosi (sviluppo diretto). L'accrescimento, che ha maggiore velocità nel periodo giovanile, ha luogo subito dopo ogni evento di muta, quando il nuovo carapace è ancora elastico e l'organismo può aumentare la sua taglia.
Nei laghi e nelle raccolte d'acqua permanenti, gli individui di sesso maschile schiudono dalle uova partenogenetiche nel solo periodo autunnale, in risposta verosimilmente a stimoli ambientali quali il raffreddamento delle acque, la diminuita disponibilità di cibo e l'abbreviarsi della fase luminosa del fotoperiodo. Il risultato della riproduzione sessuata è la fecondazione di un unico uovo, che viene racchiuso in uno spesso involucro del carapace noto come efippio. Tale struttura si sviluppa nella regione dorsale, in corrispondenza della camera di incubazione (Fig. 1B). L'efippio protegge l'uovo duraturo dalla disidratazione e dagli estremi di temperatura, al punto che può essere conservato per lunghi periodi di tempo senza che ne sia compromessa la vitalità. La deposizione degli efippi non rappresenta necessariamente l'atto finale dell'attività riproduttiva del Cladocero, ma solo una sua fase.

Figura 2: Postaddome di Ceriodaphnia dubia:
1) femmina partenogenetica; 2) dettaglio dell'artiglio terminale; 3) maschio (Berner, 1986)

Dopo la produzione di uova anfigoniche può essere ripresa, infatti, la produzione di uova partenogenetiche. Gli individui muoiono solo se intervengono fattori letali, come il prosciugamento del bacino, la mancanza di cibo, i valori estremi di temperatura, lasciando tuttavia le uova durature negli efippi dai quali, dopo reidratazione ed esposizione alla temperatura appropriata, schiuderanno individui di sesso femminile che si riprodurranno nuovamente per via partenogenetica.

A2 - Allevamento degli organismi

L'allevamento di *Ceriodaphnia* deve essere avviato 2-3 settimane prima della conduzione dei

saggi, al fine di disporre di femmine acclimatate alle condizioni di mantenimento del laboratorio e che siano in grado di produrre un numero di neonati sufficienti alla sperimentazione. Grazie alla prolificità delle femmine, solo pochi individui (20-30) sono necessari per l'avvio dell'allevamento. In caso di trasporto, questi possono essere trasferiti in un contenitore di polietilene da 1 litro, completamente riempito, nel numero di 20-30 individui. L'acclimatazione alle condizioni colturali del nuovo laboratorio deve essere graduale, al fine di evitare morie massive degli organismi. La procedura da preferire consiste nella progressiva sostituzione dell'acqua di spedizione con percentuali crescenti (25%, 50%, 75%, 100%) del mezzo in uso nel laboratorio, completando il trasferimento in 48-72 ore. Anche per quanto riguarda la temperatura, i bruschi cambiamenti devono essere evitati, limitando le variazioni a 2-3°C nell'arco di 24-48 ore.
È preferibile organizzare l'allevamento secondo due procedure aventi diversa finalità. I due tipi di allevamento che ne derivano sono definibili l'uno come "massivo" e l'altro come "controllato".
L'allevamento di tipo massivo ha come scopo quello di garantire la sopravvivenza della specie in laboratorio e di fornire gli organismi necessari all'allevamento controllato. Per la procedura massiva sono utilizzati dei contenitori da 1-2 L, tipo beaker o cristallizzatori, ma anche dei piccoli acquari in "tutto vetro" possono prestarsi allo scopo. Almeno due colture, ma preferibilmente più di due, sono mantenute in recipienti distinti. Esse sono allestite con non più di 40-50 organismi per ogni litro di mezzo, alimentati giornalmente e trasferiti in mezzo fresco almeno una, ma meglio due volte per settimana. Ogni 14 giorni la coltura viene scartata e riallestita con un nuovo gruppo di neonati appartenenti alla terza schiusa o successive.
Gli allevamenti di tipo controllato sono mantenuti come fonte diretta di neonati per i saggi tossicologici. In questo caso le femmine di *C. dubia* possono essere allevate sia in piccoli gruppi, che singolarmente, ed in entrambi i casi, ogni individuo deve avere a disposizione un volume di almeno 15 mL di mezzo. La somministrazione del cibo è quotidiana ed il trasferimento degli organismi deve essere effettuato almeno a giorni alterni, ma preferibilmente anch'esso con frequenza giornaliera. Nel caso venga adottata la soluzione minima di tre cambi settimanali, lunedì, mercoledì e venerdì sono i giorni consigliati. Si tenga presente tuttavia, che giornalmente si deve procedere alla rimozione e alla conta dei neonati prodotti.
Se l'allevamento è in buone condizioni, ogni femmina dovrebbe produrre tre schiuse nell'arco di 7 giorni (25±1°C), con un numero medio di neonati pari o superiore a 15; nello stesso arco di tempo, gli eventuali decessi non devono superare il limite del 20%. In caso contrario sussistono dei problemi che sono solitamente dipendenti dalla qualità del mezzo o della dieta. Dopo un massimo di 4 giorni, le femmine adulte sono scartate e gli allevamenti riallestiti con giovani individui di terza schiusa o successive.
Anche nel caso degli allevamenti di tipo controllato è consigliabile mantenere più gruppi di organismi o più serie di singoli individui, sfalsate nell'allestimento di una settimana, e ciò per garantire una disponibilità praticamente continua di neonati.

A3 - Acqua di allevamento

C. dubia può essere allevata con successo in acque di vario tipo quali acque di falda e acque superficiali non contaminate ed anche in acque di rete, purchè non clorate. Al fine di non esporre gli organismi in coltura a continue, e talvolta eccessive, variazioni delle caratteristiche del mezzo, sono da preferire quelle fonti che dimostrano, nel tempo, la maggiore stabilità dei parametri chimico fisici. In considerazione dei molteplici aspetti che debbono essere soddisfatti dal mezzo di allevamento (tossicologico, nutrizionale, di riproducibilità dei risultati, di facilità di approvvigionamento, ecc.) l'impiego di un'acqua minerale, o più esattamente l'impiego di un'acqua sintetica preparata a partire da un'acqua minerale di tipo commerciale, si può configurare come una soluzione ottimale. Un'acqua di questo tipo è infatti facilmente disponibile, altrettanto facilmente preparabile, è di qualità nota e poco variabile, permette buoni risultati in termini di accrescimento e attività riproduttiva e ne assicura la riproducibilità. Sono possibili due modi di impiego di un'acqua minerale scelta tra quelle disponibili in commercio.
Nel primo caso, ci si serve di un'acqua con un elevato contenuto di sali e ad una certa ali-

quota di acqua minerale viene aggiunta acqua Milli-Q o di qualità equivalente, in modo da ottenere, per diluizione, il mezzo semisintetico con le caratteristiche volute. Nel secondo caso, ci si serve di un'acqua a basso contenuto di sali (oligominerale), che viene corretta nei suoi costituenti maggiori mediante l'aggiunta di sali di grado analitico per dare il mezzo con i valori di alcalinità e durezza desiderati.
Entrambe le soluzioni sono state ampiamente collaudate con successo (US EPA, 1989; Viganò, 1991, 1992; Cooney et al., 1992a). Al più si può osservare che nel secondo tipo di impiego il pool di micronutrienti, fornito dall'acqua minerale prescelta, resta invariato nei diversi mezzi di coltura ottenibili. Inoltre, il secondo tipo di applicazione evita, a differenza del primo, il rischio tossicologico introdotto dall'uso di acqua deionizzata per la diluizione dell'acqua minerale, rischio che periodicamente si potrebbe concretizzare in effetti negativi sulla coltura del cladocero (Cooney et al., 1992b), a meno di controlli assidui sulla efficienza del deionizzatore. Nel primo tipo di applicazione infine, può formarsi un precipitato nei mezzi di coltura con durezza ≥180 mg $CaCO_3$/L (US EPA, 1989: Patterson et al., 1992).
Fatta eccezione per quelle colture di organismi che sono dedicate a saggiare dei campioni con caratteristiche peculiari, in generale si consiglia di adottare un mezzo semisintetico con le seguenti caratteristiche: durezza 140-160 mg $CaCO_3$/L, alcalinità 110-120 mg $CaCO_3$/L, Ca/Mg **>**1 e prossimo a 4, Na/K **>**1 e prossimo a 10. L'acqua semisintetica viene preparata in volumi dell'ordine di alcune decine di litri e conservata in recipienti di vetro o polietilene dedicati esclusivamente a questo scopo. I recipienti devono essere mantenuti al riparo da fonti di contaminazione e preferibilmente anche dalla luce per evitare crescite algali o batteriche indesiderate.
Se viene utilizzata un'acqua naturale, è necessario filtrarla attraverso membrane da 0,22 μm, minimizzando in questo modo l'eventualità di un apporto incontrollato di cibo o comunque di particelle aventi valore nutrizionale, come pure l'introduzione di agenti patogeni o di altri organismi indesiderati. Se necessario, si può correggere il contenuto di alcuni dei costituenti maggiori aggiungendo sali di grado analitico ($MgSO_4$, $CaCl_2$, $NaHCO_3$, KCl) o diluendo con acqua Milli-Q. Il passaggio su una colonna di carbone attivo può avere un effetto migliorativo sulla qualità del mezzo, e tuttavia si raccomanda il controllo analitico periodico di alcuni parametri.
Qualora si voglia adottare un nuovo mezzo di coltura è opportuno verificarne preliminarmente l'idoneità su un numero limitato di organismi. La procedura consigliata è quella del confronto con un mezzo di idoneità comprovata e a tale scopo si allestisce un saggio della durata minima di 7 giorni, nel quale due gruppi di 10 organismi ciascuno, sono esposti rispettivamente ai due mezzi da confrontare. La procedura è lo stessa prevista per il saggio cronico con *C. dubia*, ed i parametri di interesse sono sopravvivenza e attività riproduttiva a cui possono essere aggiunti la lunghezza o il peso secco degli organismi.

A4 – Alimentazione

Sono varie le diete che sono state e sono utilizzate con successo per nutrire *C. dubia*. Generalmente, esse risultano dalla combinazione di più ingredienti, ciascuno dei quali insufficiente al mantenimento del crostaceo, se somministrato singolarmente (Cooney et al., 1992b; Knight e Waller, 1992; Viganò, 1992). Di solito si tratta di colture di una o più specie algali, di mangime per pesci, di lievito o suoi estratti, di foglie di cereali, vitamine e così via. Sembra accertato che il componente di base della dieta debba essere un'alga unicellulare. La Cloroficea *Selenastrum Capricornutum* (preparata come in A5.1) si è dimostrata idonea allo scopo e va somministrata quotidianamente, in modo da garantire una densità pari, orientativamente, a 200-250.000 cell/mL (US EPA, 1989; Cooney et al., 1992b). I metodi EPA (1989) e ASTM (1989) prevedono che la dieta algale venga integrata con un secondo alimento rappresentato da una miscela di tre ingredienti: mangime per pesci, foglie di cereali (Cerophyl®) e lievito (vedi A5.2). Questo alimento, preparato in sospensioni contenenti 1,8 g/L di solidi sospesi, è somministrato giornalmente in volumi pari a 100 mL per 15 mL di mezzo acquoso, o anche in ragione di 12 mg di solidi per ogni litro di coltura di *C. dubia*. Sia nel caso in cui la sospensione venga preparato di fresco o sia ottenuta da una aliquota scongelata, se ne consiglia il rinnovo con frequenza settimanale.

Nei laboratori IRSA-CNR è in uso una dieta semplificata secondo la quale l'alga *S. capricornutum* è somministrata ad una densità di poco superiore a quella della dieta originale, unitamente o una sospensione di lievito e a una soluzione di vitamine (vedi A5.3).

A5 - Preparazione della dieta

A5.1 - Sospensione algale

L'alga *S. capricornutum* viene coltivata in un mezzo di coltura preparato a partire da quattro soluzioni composte dai sali di seguito indicati:

Soluzione 1:			
	$NaNO_3$	25,500	g/L
	$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	12,164	g/L
	$CaCl_2$	4,410	g/L
	H_3BO_3	185,520	mg/L
	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	415,380	mg/L
	$ZnCl_2$	3,270	mg/L
	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	1,428	mg/L
	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0,012	mg/L
	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	7,260	mg/L
	$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	160,000	mg/L
	$Na_2EDTA \cdot 2H_2O$	300,000	mg/L
Soluzione 2:			
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	14,700	g/L
Soluzione 3:			
	K_2HPO_4	1,044	g/L
Soluzione 4:			
	$NaHCO_3$	15,000	g/L

I sali di grado analitico, vengono solubilizzati in acqua bidistillata o Milli-Q filtrata su membrane da 0,22 μm. Il mezzo di coltura è ottenuto per diluizione delle quattro soluzioni in ragione di 2 mL di ciascuna di esse per ogni litro di mezzo. La diluizione è anch'essa effettuata con acqua bidistillata o Milli-Q filtrata attraverso membrane con porosità di 0,22 μm. Il mezzo viene inoculato con un volume di sospensione algale tale da ottenere una densità di circa 200.000 cell/mL. Il mezzo inoculato è posto in incubazione alla temperatura di 20±2°C, con un fotoperiodo dl 16 ore di luce/8 ore di buio e un'intensità luminosa di circa 400 lux fornita da lampade del tipo cool-white. Nel corso dell'incubazione, il mezzo è aerato insufflando aria filtrata attraverso cannule in vetro con un flusso sufficiente a mantenere le cellule algali continuamente disperse. La scarsa agitazione può rendere inutilizzabile la coltura. Dopo 5-6 giorni di incubazione la biomassa algale raggiunge una densità prossima ai 9-10 milioni di cell/mL e si procede alla sua separazione dai residui del mezzo di coltura. Tale operazione si effettua per centrifugazione della sospensione a circa 400 RCF per 5-10 minuti. Il sovranatante è eliminato mentre le alghe vengono ridisperse in acqua, utilizzando preferibilmente quella di allevamento del cladocero ma con durezza ridotta a 30-50 $CaCO_3$/L. Si procede quindi, ad una seconda centrifugazione ed alla raccolta delle cellule algali in un unico contenitore nel quale verranno conservate. In mancanza di una centrifuga o di un rotore di dimensioni adeguate, si pongono i contenitori usati per la coltura dell'alga in un frigorifero e si lasciano in quiete per diversi giorni in modo che le cellule possano sedimentare; i residui del mezzo di coltura sono poi rimossi per sifonamento (ASTM, 1989; US EPA, 1989). Il volume finale della sospensione, per i cui aggiustamenti si ricorre alla stesa acqua dei lavaggi, deve essere tale da approssimare una densità di circa 100 milioni di cell/L. La sospensione algale così ottenuta è conservabile per alcuni mesi al buio e alla temperatura di 4°C e potrà essere la fonte dell'inoculo della successiva coltura.
Le operazioni descritte per la coltura del *S. capricornutum* devono essere condotte rispettando alcune precauzioni elementari volte a prevenire la contaminazione della coltura da parte

di altre specie, algali e non. Si deve operare pertanto, in condizioni di massima pulizia, meglio se in condizioni asettiche (sterilizzazione dei recipienti con autoclave, cappe a flusso laminare ecc.) anche se una limitata contaminazione batterica non sembra influire negativamente sul risultato finale (ASTM, 1989).

A5.2 – Alimento composito

L'alimento composito che in letteratura è spesso indicato con la sigla "YTC" (ASTM, 1989; US EPA, 1989), viene preparato secondo le seguenti indicazioni.
La preparazione a base di cibo di pesce richiede una settimana. Ad 1 L di acqua Milli-Q vengono aggiunti e miscelati 5 g di mangime pelletizzato per trota o mangime in scaglie (Tetramin®). La sospensione viene mantenuta in aerazione per una settimana, a temperatura ambiente, compensando l'evaporazione con acqua Milli-Q e tenendo il contenitore preferibilmente sotto una cappa aspirante a causa dell'odore sgradevole che si sviluppa durante il processo di digestione. Al termine, il contenitore viene posto in un frigorifero e lasciato in quiete in modo che la sospensione digerita possa sedimentare per un minimo di 1 ora. Si procede alla filtrazione attraverso un retino con maglie di apertura di 100-150 mm e si scarta il particellato.
Per la preparazione delle foglie di cereali, 5 g del prodotto in polvere (Cerophyl®) vengono dispersi in 1 L di acqua Milli-Q. Mediante un agitatore magnetico, la sospensione viene mantenuta in agitazione a velocità moderata per un massimo di 24 ore e lasciata poi sedimentare per almeno 1 ora, ed eventualmente filtrata attraverso un retino con maglie da 100-150 mm, scartando il materiale particolato.
Per la preparazione a base di lievito, si disperdono energicamente 5 g di lievito disidratato (*Saccharomyces cerevisiae*) in acqua Milli-Q, sino alla completa sospensione del prodotto.
L'alimento composito è ottenuto per miscelazione di uguali volumi (circa 300 mL) dei tre preparati e cioè, della sospensione di lievito, della fase decantata od ottenuta per filtrazione di mangime di pesce e di quella ottenuta dalle foglie di cereali.
Prima che l'alimento composito possa essere utilizzato per la coltura di *C. dubia*, è necessario che ne venga determinato il contenuto di solidi sospesi. Tale contenuto, calcolato come media del valore di due repliche di 5 mL ciascuna, essiccate a 105°C per 24 ore, deve essere aggiustato, se necessario, ad un valore di 1,8 g/L. L'alimento può essere suddiviso in aliquote di 50-100 mL che verranno congelate e in tal modo conservate fino al momento dell'uso. Il cibo scongelato e conservato in frigorifero, potrà essere usato per un massimo di 2 settimane, ma sostituito preferibilmente dopo una sola settimana.
In alcuni laboratori, il processo di preparazione periodica e congelamento è limitato al solo mangime di pesce che viene pertanto, miscelato con aliquote preparate al momento dell'uso tanto a di lievito che di Cerophyl®. Il periodo massimo d'impiego resta invariato.

A5.3 – Dieta semplificata

Presso i laboratori dell'IRSA-CNR è in uso una dieta semplificata rispetto a quella proposta nei metodi US EPA(1989) o ASTM (1989) e descritta nei paragrafi precedenti. Nella dieta semplificata, l'alga *S. capricornutum* è somministrata giornalmente in modo da garantire densità di 300.000 cell/mL, mentre l'alimento composito è stato sostituito con una sospensione di cellule di lievito (*S. cerevisiae*) ed una soluzione di tre vitamine.
La prima è preparata con i panetti di lievito commercializzati per la panificazione. Nell'acqua usata per l'allevamento di *C. dubia*, con durezza ridotta a 30-50 mg $CaCO_3$/L viene dispersa una quantità di lievito tale da approssimare la densità di 100 milioni di cell/mL. Come nel caso dell'alga, anche la sospensione di lievito è conservabile al buio, a 4°C ed è somministrata giornalmente in volumi tali da garantire una densità di 300.000 cell/mL.
Le vitamine sono preparate in un'unica soluzione contenente tiamina cloridrato (vitamina B_1) 75 μg/L, biotina (vitamina H) 0,75 μg/L e cianocobalamina (vitamina B_{12}) 1 μg/L. Per agevolare l'impiego di quantitativi così modesti si consiglia di ricorrere a una o più soluzioni concentrate. La soluzione di vitamine, che è conservabile congelata per tempi pressochè indefiniti, viene aggiunta al momento dell'uso all'acqua di allevamento del crostaceo e nella quantità di 1mL/L.

A6 - Riproduzione

L'attività riproduttiva di *C. dubia* è largamente dipendente dalla temperatura, dalla qualità dell'acqua e dalla qualità e quantità del cibo (ASTM, 1989). La temperatura dell'acqua delle colture deve essere mantenuta al valore cui saranno condotte le prove di tossicità e pertanto a 20±1°C o 25±1°C. *C. dubia* ha ricevuto grande attenzione soprattutto perchè permette di condurre una saggio cronico in 7 giorni a 25°C, mentre il saggio acuto con questo organismo è di interesse minore se non quando è posto in relazione con i dati di tipo cronico. Per questo motivo la grande maggioranza dei saggi acuti è condotta alla temperatura di 25°C, invece che a 20°C, e per lo stesso motivo gran parte dei dati sulla riproduzione e sull'allevamento di *C. dubia* proviene da colture mantenute a 25°C. Se. tuttavia, si decide di allevare l'organismo a 20±1°C, si tenga presente che la sua longevità aumenta (da circa 30 a 50 giorni), che diminuisce la frequenza dello schiuse prodotte, e che il numero medio di neonati per schiusa è maggiore che non alla temperatura superiore (Cowgill et al., 1985).
Il fotoperiodo consigliato è di 16 ore di luce e 8 di buio. All'opposto una consistente riduzione delle ore di luce potrebbe stimolare una indesiderata produzione di individui di sesso maschile al punto che il mantenimento della stessa coltura diverrebbe problematico (Cooney et al., 1992a). Per quanto riguarda l'intensità luminosa, livelli comunemente riscontrabili in laboratorio possono essere accettabili e, in ogni caso, si consigliano valori che siano compresi nell'ambito di 500-1000 lux. Si tenga presente che le elevate intensità luminose possono indurre un'attività fotosintetica del *Selenastrum* somministrato come alimento, tale da aumentare il pH del mezzo sino a valori che potrebbero rivelarsi dannosi o anche letali per il crostaceo (Δ pH 9). Compatibilmente con il potere tampone dell'acqua di coltura e con la densità di alghe presenti, può essere preferibile mantenere valori di intensità luminosa prossimi al limite inferiore dell'intervallo consigliato (ASTM, 1989).
Alla temperatura di 25±1°C, *C. dubia* produce 3 schiuse in 7 giorni, con una sequenza secondo la quale la prima schiusa è prodotta al quarto giorno di vita ed è costituita da 3-6 neonati; la seconda è prodotta al quinto o anche al sesto giorno e si compone, mediamente, di 5-10 neonati; la terza schiusa infine, ha luogo al settimo giorno e può comprendere da 7 a 14 individui. I valori minimi e massimi sopra riportati che peraltro hanno valore indicativo, si riferiscono rispettivamente ad un'attività riproduttiva accettabile e ad una ottimale. Valori inferiori a 15 neonati totali nelle prime tre schiuse indicano la presenza di problemi nella coltura.

A7 - Organismi per il saggio

Per l'allestimento del saggio devono essere utilizzati i neonati di *C. dubia* aventi età ≤24 ore e appartenenti alla terza schiusa o successive. Se l'acqua del corpo idrico da saggiare o l'acqua usata per le diluizioni di effluente, hanno caratteristiche sostanzialmente diverse dall'acqua usata per la coltura degli organismi, è necessario che i neonati da utilizzare nel saggio, siano prodotti da femmine allevate per almeno 7 giorni nella stessa acqua usata per le diluizioni del saggio di tossicità o in un'acqua con caratteristiche similari.
Gli organismi da saggiare devono provenire da un gruppo di femmine mantenute in condizioni di allevamento controllato. Non si devono utilizzare i neonati prodotti da femmine che non rispondono ai criteri di qualità indicati per la sopravvivenza e l'attività riproduttiva, o che comunque manifestino sintomi di condizioni colturali scadenti. Come ulteriore criterio guida si può suggerire l'utilizzabilità di neonati appartenenti a schiuse composte da almeno 7-8 individui. I neonati prodotti nelle 24 ore immediatamente precedenti all'allestimento del saggio hanno l'età richiesta per la conduzione della prova tossicologica. È preferibile che essi siano nutriti se non utilizzati entro 2-3 ore dalla raccolta.

BIBLIOGRAFIA

ASTM (1989): "*Standard guide for conducting three-brood, renewal toxicity tests with Ceriodaphnia dubia*", American Society for Testing and Materials, ASTM E 1295-89.

BERNER D.B. (1986): "*The taxonomy of Ceriodaphnia (Crustacea: Cladocera)*". in U.S. Environmental Agency cultures. Environmental Monitoring and Support Laboratory, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, 45268, EPA/600/4-86/032.

COONEY J.D., DEGRAEVE G.M., MOORE E.L., LENOBLE B.J., POLLOCK T.L. & SMITH C.I. (1992a): "Effects of environmental and experimental design factors on culturing and toxicity testing of *Ceriodaphnia dubia", Environ. Toxicol. Chem.,* **11***,* 839-850.

COONEY J.D., DEGRAEVE G.M., MOORE E.L., LENOBLE B.J., PALMER W.D. & POLLOCK T.L. (1992b): "Effects of food and water quality on culturing of *Ceriodaphnia* dubia", *Environ. Toxicol. Chem.*, **11**, 823-837.

COWGILL U.M., KEATING K.I. & TAKAHASHI I.T. (1985): "Fecundity and longevity of *Ceriodaphnia dubia/affinis i*n relation to diet at two different temperatures", *J. Crust. Biol.*, **5**, 420-429.

KNIGHT J.T. & WALTER W.T. (1992): "Influence of the addition ot Cerophyl on the *Selenastrum capriornutum* diet of the cladoceran *Ceriodaphnia dubia*", *Environ. Toxicol. Chem.,* **11**, 521-534.

MARGARITORA, F. (1983): "Cladoceri (Crustacea: Cladocera), in *"Guide per il riconoscimento delle specie animali nelle* acque *interne italiane*, CNR, P. F. "Promozione della Qualità dell'Ambiente n. 22, CNR AQ/1/197, pp. 169.

MOUNT. D.I. & NORBERG T.I. (1984): " A seven-day life-ycle cladoceran toxicity test", *Environ. Toxicol. Chem.*, **3**, 425-434.

PATTERSON P.W., DICKSON K.L., WALLER W.T. & RODGERS J.H. (1992): "The effects of nine diet and water combinations on the culture health of *Ceriodaphnia dubia*", *Environ. Toxicol. Chem*, **11**, 1023-1035.

RUE J.W., FAVA J.A. & GROTHE D.R. (1988): "A review of inter- and intralaboratory effluent toxicity test method variability, in *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment*, 10th vol., ASTM STP 971, W.J. Adams, G.A. Chapman and W.G. Landis, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 190-203.

US EPA (1989): "*Cladoceran, Ceriodaphnia dubia survival and reproduction test*", Method 1002, in *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms,* C.I. Weber, W.H. Peltier, T.J. Norberg, W. B. Horning, F.A. Kessler, J. Menkedick et al., EMSL, U.S Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, EPA-600/4-89-00l.

US EPA (1991): "*Methods for measuring toxicity of effluents to freshwaters and marine organisms*", U.S Environmental Protection Agency, Report EPA/600/4-90/027, Cincinnati, OH.

VIGANÒ L. (1991): "Suitability of commercially available spring waters as standard for culturing *Daphnia magna*", *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **47**, 775-782.

VIGANÒ L. (1992): "Prime applicazioni del saggio a 7 giorni con *Ceriodaphnia dubia* allo studio della tossicità di acque superficiali", in *Atti del 5° Congresso Nazionale S.It.E.,* Marchetti R. e Cotta Ramusino M. eds., Milano 21-25 settembre, 677-682.

8050. Metodo di valutazione della tossicità acuta con *Mysidopsis bahia*

1. Introduzione

Viene descritta la procedura standard per saggi di tossicità acuta su campioni di acque di scarico o di corpi idrici con il crostaceo marino *Mysidopsis bahia*. I risultati ottenibili da un saggio acuto costituiscono solitamente il primo passo nella valutazione di rischio per la vita acquatica. L'assenza di effetti acuti non preclude la possibilità di effetti cronici. Inoltre, un risultato negativo con un dato campione non esclude il riscontro di effetti tossici acuti in campioni prelevati in diversi momenti e ciò a causa, ad esempio, della possibile variabilità di uno scarico come anche della capacità di diluizione delle acque recettrici.

2. Generalità sul metodo

Dei giovani esemplari del crostaceo marino *Mysidopsis bahia* sono esposti per un tempo massimo di 96 ore ad uno scarico o all'acqua di mare dell'area indagata, con lo scopo di evidenziare la presenza di sostanze tossiche in concentrazioni tali da causare effetti di tipo acuto. La procedura di saggio per un effluente prevede che un minimo di cinque gruppi di organismi coetanei, aventi età compresa tra 1 e 5 giorni, sia mantenuto a cinque diluizioni, in acqua di mare, dell'effluente da saggiare. I decessi osservati sono poi elaborati per calcolare il valore di diluizione che si rivela letale per il 50% degli organismi (LC_{50}) a un determinato tempo di esposizione (24 ore, 48 ore o 96 ore). La validità del risultato è giudicata osservando la risposta di un ulteriore gruppo di controllo che è stato mantenuto per lo stesso tempo di esposizione e nella medesima acqua di mare, ma senza aggiunta di effluente.
La stessa procedura può essere applicata per rilevare la presenza di effetti tossici acuti nell'acqua di mare dell'area recettrice o di altre zone. È tuttavia infrequente che i contaminanti raggiungano in quest'ultima delle concentrazioni tali da permettere la determinazione di una LC_{50}. Pertanto il saggio si limita ad indagare l'eventuale risposta degli organismi ad un campione non diluito, e la validità del risultato, che ben raramente va al di là di pochi decessi, è determinata in base al confronto con organismi di controllo esposti ad acqua di mare non contaminata. Si fa notare che per *M. bahia* è disponibile la metodica standard (Sezione 8090) per condurre un saggio cronico la cui durata (7 giorni) è di poco superiore alle 96 ore previste per il saggio acuto descritto in queste pagine. Poichè con semplici accorgimenti è possibile ottenere informazioni sia sulla tossicità di tipo acuto che su quella di tipo cronico mediante un unico saggio di 7 giorni, quest'ultimo è da preferire ogni qualvolta sia possibile. Se si adotta tale soluzione, è necessario attenersi alla procedura di saggio cronico alla quale si rinvia.

3. Conduzione del saggio

3.1 Materiali a strumentazione

La conduzione del saggio di tossicità richiede:

- numero minimo di 10 bicchieri di vetro borosilicato (beaker) con volume utile pari ad almeno 200 mL;
- lampade fluorescenti ad ampio spettro controllate da un temporizzatore con il

quale regolare il fotoperiodo, e possibilmente anche da un dispositivo che permetta la transizione regolare tra le fasi di luce e di buio;
- bagno o camera termostatati per il mantenimento della temperatura delle soluzioni da saggiare a 20±1°C per tutta la durata della sperimentazione;
- analizzatore di ossigeno disciolto;
- misuratore di salinità;
- fonte di aria compressa a bassa pressione con diffusori in pietra porosa o cannule di vetro. I compressori che comunemente alimentano gli impianti centralizzati immettono oli e altri contaminanti nella rete di distribuzione che vanno rimossi con cartucce di carbone attivo;
- 2-4 imbuti separatori con volume di 2 L per la schiusa di Artemia salina;
- cisti di Artemia salina che rispondono ai requisiti indicati in Appendice;
- miscela di sali per la preparazione di acqua di mare artificiale. La miscela commercializzata con il marchio Forty Fathoms® ha dato buoni risultati nella conduzione dei saggi e nella coltura di M. bahia (vedi Appendice).

3.2 Organismi per il saggio

Gi organismi appartenenti alla specie *M. bahia* devono avere età compresa tra 1 e 5 giorni. In tale ambito, l'età degli organismi saggiati non può differire per più di 24 ore. I giovani crostacei rispondenti a questi requisiti sono facilmente ottenibili da femmine adulte le cui uova mostrino la macchia oculare degli embrioni in corso di sviluppo. Esse vengono isolate dalle vasche della coltura di laboratorio almeno 24 ore prima dell'allestimento del saggio, come descritto in Appendice.

3.3 Acqua di diluizione

In base alle finalità del saggio, è opportuno scegliere il tipo di acqua di diluizione più adeguato.

a) Se l'obiettivo è di stimare la tossicità acuta di un effluente producendo un dato assoluto e indipendente dalle caratteristiche delle acque recettrici, verrà utilizzata un'acqua di diluizione sintetica standard. A titolo di esempio, in Tab. 1 sono elencati i sali con i rispettivi dosaggi necessari per la preparazione di acqua di mare sintetica con salinità pari a circa 31‰. Salinità maggiori o minori sono ottenute con quantità della miscela salina adeguate in proporzione. Per la preparazione dell'acqua di mare si usa acqua Milli-Q o deionizzata di qualità equivalente alla quale vengono aggiunti i nove sali elencati in Tab. 1, singolarmente, secondo la sequenza indicata e assicurandosi che ciascuno si sia sciolto prima dell'aggiunta del successivo.
   Per la preparazione dell'acqua di mare sintetica sono utilizzabili anche le miscele di sali già pronte e disponibili in commercio, quali Forty Fathoms® o altre, purchè soddisfino i criteri di validità del saggio. L'accrescimento, l'attività riproduttiva e le altre manifestazioni vitali fortemente dipendenti dalla qualità dell'acqua sono difficilmente soddisfatte da una miscela semplificata come quella riportata in Tab. 1 e pertanto, se l'acqua sintetica deve essere impiegata anche nei saggi cronici e per la coltura degli organismi, si consiglia solo l'uso di miscele complete. La salinità prevista per un saggio in condizioni standard è di 35‰.
b) Nel caso la finalità del saggio sia quella di stimare la tossicità acuta di uno scarico nelle acque recettrici non contaminate, sarà necessario usare come acqua di diluizione quella prelevata nell'area di sversamento ma in zona non inquinata. L'acqua di diluizione dovrebbe essere prelevata immediatamente prima del saggio o comunque, non oltre 96 ore dallo stesso. Se non usata entro 24 ore dal prelievo, l'acqua di diluizione verrà refrigerata (4°C). Se l'area recettrice è contaminata o sospettata di esserlo, si può ricorrere ad acque naturali o semisintetiche aventi caratteristiche fisiche e chimiche il più possibile simili a quelle dell'acqua recettrice.
c) Se infine, l'obiettivo del saggio è di esaminare le interazioni tra i contaminanti dello scarico e quelli già presenti nell'acqua recettrice, quest'ultima sarà utilizzata come acqua di di-

luizione indipendentemente dal suo grado di contaminazione, purchè prelevata al di fuori dell'area influenzata dallo scarico in esame. Nell'allestimento di questo tipo di saggio è necessario includere un secondo gruppo di controllo in cui gli organismi vengono esposti solo ad acqua di allevamento.

Tabella 1: Elenco dei sali di grado analitico e quantitativi necessari alla preparazione di acqua di mare artificiale di salinità 31‰

COMPOSTO	CONCENTRAZIONE (g/L)	QUANTITA' RICHIESTA per 20 L
$NaCl$	21,03	420,6
Na_2SO_4	3,52	70,4
KCl	0,61	12,2
KBr	0,088	1,76
$Na_7B_4O_7 \cdot 10\ H_2O$	0,034	0,68
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	9,50	190,0
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,32	26,4
$SrCl_2\ 6H_2O$	0,02	0,4
$NaHCO_3$	0,17	3,4

Generalmente un effluente ha una salinità trascurabile. Gli organismi devono tuttavia essere esposti alle diverse diluizioni di uno scarico senza che le differenti salinità delle soluzioni possano rappresentare una fonte di stress aggiuntivo a quello dei tossici o più semplicemente una fonte di variabilità dei risultati. Si tratta pertanto di uniformare la salinità delle diverse diluizioni di acqua di scarico. A questo scopo, si dispone di due soluzioni: la prima prevede l'impiego di acqua di mare ipersalina (100‰) come acqua di diluizione, mentre la seconda consiste nell'aggiungere i sali per la preparazione di acqua di mare artificiale.
Il principale vantaggio della prima soluzione è che l'acqua ipersalina può essere ottenuta, previa filtrazione ($\leq 1 \mu m$) e per evaporazione controllata (<40°C), da acqua di mare naturale di elevata qualità (aree pelagiche). Come tale essa contiene tutti i micronutrienti e colloidi biogenici richiesti per l'accrescimento e l'attività riproduttiva degli organismi marini, e può essere conservata al buio e a temperatura ambiente per periodi prolungati senza apparente degradazione. Il limite della prima soluzione risiede nel fatto che un effluente può essere saggiato ad una concentrazione massima non superiore all'80% se la salinità prescelta è del 20‰, od anche del 70% se la salinità voluta è del 30‰. La seconda soluzione non presenta questo limite ma l'aggiunta di sali può, dal canto suo, modificare il pH dell'effluente o dell'eventuale acqua che richiede aggiustamenti, potendo alterare in tal modo anche la tossicità del campione. In generale, si tenga presente che valori di pH al di fuori dell'intervallo 6-9 possono contribuire alla mortalità degli organismi. Se necessario il pH può essere riportato al valore desiderato con aggiunte di HCl o NaOH. Dopo l'aggiunta dei sali la soluzione viene mantenuta in agitazione moderata per circa 60 minuti con l'aiuto di un agitatore magnetico, e ciò per garantire che tutti i sali siano entrati in soluzione prima di introdurre gli organismi. È consigliabile includere nella serie dei trattamenti anche un controllo con acqua preparata in modo analogo per aggiunta di sali, al fine di verificare che tale procedura non causi effetti negativi.

3.4 Illuminazione

Il saggio viene condotto conservando le stesse condizioni di illuminazione alle quali sono allevati gli organismi. Il sistema di lampade fluorescenti ad ampio spettro deve fornire a livello dell'area di sperimentazione un'intensità luminosa compresa tra 500 e 1000 lux con un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio.

3.5 Temperatura

La temperatura a cui devono essere mantenute le soluzioni sottoposte a saggio è di 20 ±1°C.

Questa condizione è raggiunta immergendo i beaker del saggio in un bagno termostatato o operando all'interno di un ambiente interamente condizionato alla temperatura voluta. Nel caso il risultato tossicologico debba essere usato per indagare il rapporto tra la tossicità acuta e cronica dell'effluente in esame, il saggio acuto deve essere condotto alla stessa temperatura di 26-27°C prevista per il saggio cronico.

3.6 Alimentazione

I giovani di *M. bahia* sono alimentati con naupli di *A. salina* schiusi, preferibilmente, da alcune ore e non oltre le 24 ore (vedi Appendice A4). I naupli sono somministrati sia durante il periodo di mantenimento precedente il saggio (massimo 5 giorni) che durante il saggio stesso. Nel corso della prova l'alimentazione è quotidiana e può essere quantificata sulla base di circa 100 naupli per ogni misidaceo. Se la somministrazione dell'intera quantità di cibo causasse un deficit significativo della concentrazione di O_2 disciolto, essa può essere ripartita in due tempi (50 naupli/misidaceo) adeguatamente distanziati nell'arco della giornata.

3.7 Ossigeno disciolto

In presenza di valori elevati di BOD e alle concentrazioni più elevate di acqua di scarico è maggiore il rischio che l'ossigeno disciolto scenda a livelli critici, non compatibili con la sopravvivenza degli organismi. Si raccomanda pertanto di controllare questo parametro e con maggior frequenza durante le prime ore di sperimentazione. Se la concentrazione di O_2 disciolto scende al di sotto del 60 % del valore di saturazione (Tab. 2 Sezione 8090) si rende necessario aerare le soluzioni di effluente, facendo gorgogliare aria nei beaker di saggio mediante cannule in vetro o pipette Pasteur. Nel caso si debba procedere all'aerazione di una diluizione del campione, tutte le restanti devono essere aerate in modo analogo, includendo anche i recipienti di controllo. Il flusso d'aria deve essere mantenuto ad un livello minimo che non arrechi disturbo agli organismi. Usando delle cannule di vetro o delle pipette Pasteur si può considerare come indicativo un flusso pari a 100 bolle/minuto.

4. Procedura del saggio con diluizione (effluente)

4.1 Saggio preliminare

Nel caso di campioni a tossicità completamente sconosciuta o sospettati di essere particolarmente tossici, può essere vantaggioso effettuare una prova preliminare per definire l'intervallo di tossicità entro cui condurre successivamente il saggio definitivo.
Un saggio preliminare consiste in un prova abbreviata e semplificata per la quale si preparano 5 diluizioni del campione in serie geometrica e piuttosto spaziate tra loro. La serie 100%, 10%, 1%, 0,1% e 0,01% (v/v) può essere suggerita per questo scopo. Ad ogni diluizione vengono esposti 5 neonati di *M. bahia* e dopo un periodo non superiore alle 24 h si registrano gli effetti.
Se con lo stesso campione si dovrà in seguito condurre la prova definitiva, si raccomanda di procedere nel rispetto dei limiti di conservabilità del campione stesso. Se viceversa le due prove sono condotte con campioni prelevati in momenti diversi, a causa della variabilità più o meno elevata della tossicità dello scarico o del recettore, i risultati del saggio preliminare e di quello definitivo potranno essere tra loro anche molto differenti.

4.2 Saggio definitivo

Per la conduzione della prova definitiva si allestiscono 5 diluizioni del campione da esaminare. La sequenza 100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25% (v/v) caratterizzata da un fattore di diluizione 0,5 è applicabile a gran parte delle situazioni. Viceversa, basandosi anche sulle informazioni ottenute dal saggio preliminare, si potrà adottare un diverso intervallo di sperimentazione, un diverso fattore di diluizione o anche un maggior numero di concentrazioni.

Se è stato necessario refrigerare i campioni di scarico o di acqua di diluizione, i volumi necessari alla conduzione del saggio vengono prelevati dai contenitori, previo accurato mescolamento, e portati alla temperatura di 20±1°C. Preparate le diluizioni previste con le eventuali correzioni di salinità, si misura la concentrazione di ossigeno disciolto e se questa risultasse prossima al limite del 60% del valore di saturazione, si procede ad aerare i contenitori (vedi Paragrafo 3.7). Quando le soluzioni hanno raggiunto le condizioni indicate si introducono i giovani di *M. bahia*.
Nel saggio di tossicità acuta i risultati ottenuti dalle diverse repliche vengono solitamente combinati ai fini del calcolo della LC_{50}. Ciò rende inutile l'allestimento di più repliche della stessa concentrazione, che pertanto non verrà suggerito, a meno che non venga saggiato un numero di organismi superiore a quello minimo indicato.
Per ogni diluizione di effluente si utilizzano almeno 10 giovani organismi in soluzioni di 200 mL di volume. Gli organismi vengono distribuiti secondo una sequenza casuale nei diversi contenitori sino al completamento del numero richiesto. Per evitare diluizioni significative delle soluzioni del saggio, è opportuno minimizzare il volume d'acqua trasferito con gli organismi. Questi sono più facilmente trasferibili se la pipetta provvista di bulbo elastico è mantenuta verticale sopra l'organismo da prelevare, piuttosto che frontalmente o posteriormente allo stesso.
Quando il saggio è protratto a 96 ore, dopo 48 ore di esposizione si deve provvedere al rinnovo delle soluzioni del campione saggiato. Il rinnovo quotidiano si può rendere necessario se l'effetto tossico è causato da sostanze facilmente degradabili o quando l'eventuale aerazione dei campioni causa una riduzione significativa degli effetti tossici. Per preparare le soluzioni fresche si procede secondo le condizioni precisate a proposito dell'allestimento della prova. I giovani di *M. bahia* sono trasferiti nelle soluzioni corrispondenti a quelle in cui sono già stati esposti nelle precedenti 24-48 ore di saggio.
In generale, è opportuno limitare l'evaporazione delle soluzioni di saggio per non causare variazioni della salinità oltre che della concentrazione degli inquinanti. Per controllare il fenomeno si possono usare dei fogli di polietilene trasparenti o altri dispositivi (vetro d'orologio) con i quali coprire i recipienti di saggio.
Almeno quotidianamente si ispezionano i giovani crostacei e si provvede alla rimozione e registrazione degli organismi eventualmente deceduti. Sono considerati deceduti quegli organismi che non reagiscono ad una leggera stimolazione. Per evitare di disturbare gli animali si può fare coincidere l'osservazione degli effetti con la somministrazione del cibo e le altre operazioni collegate alla conduzione del saggio.
È utile disporre dei risultati dopo 24, 48, 72 e 96 ore di esposizione, e può essere anche utile, ai fini della caratterizzazione del campione, registrare ogni altra alterazione che sia osservabile negli organismi esposti.
Gli esemplari di *M. bahia* sopravvissuti alla sperimentazione non possono essere riutilizzati ed inoltre, appartenendo ad una specie non indigena, non devono essere assolutamente dispersi nell'ambiente.

5. Procedura del saggio senza diluizione (corpo idrico)

5.1 Saggio definitivo

La soluzione che viene comunemente adottata per individuare la presenza di effetti tossici acuti nelle acque del corpo idrico, consiste nell'esporre dei giovani di *M. bahia* ad un campione non diluito di tali acque.
Se l'acqua di allevamento ha salinità diversa da quella del campione da saggiare, si procede ad acclimatare i crostacei secondo le indicazioni date in Appendice. Si tenga presente che il saggio acuto può essere condotto entro un intervallo di salinità molto ampio e cioè 5-35 ‰.
L'acqua usata per completare l'acclimatazione degli organismi, sia che si tratti di acqua naturale che di acqua sintetica, verrà anche utilizzata per allestire il controllo.
A differenza del saggio su effluenti, il campione di acqua del corpo idrico è saggiato in quattro repliche ed altrettante devono essere quelle preparate con l'acqua di controllo. In ogni re-

plica, avente il volume di 200 mL, vengono trasferiti 10 giovani individui di *M. bahia* di età ≤5 giorni. Fatta eccezione per questa parte della metodologia di saggio, tutti gli altri aspetti procedurali quali l'aerazione, il rinnovo delle soluzioni o l'alimentazione, sono da considerare invariati e si rimanda pertanto ai paragrafi precedenti.
Nel saggio senza diluizione i risultati delle quattro repliche non vengono cumulati e vengono utilizzati per determinare con metodi statistici se sono significativamente diversi da quelli osservati nel controllo.
Se il campione saggiato "tal quale" causa una mortalità superiore al 50% degli organismi, si può eventualmente procedere alla stima della LC_{50}. In questo caso il campione di acqua del recettore deve essere saggiato secondo la procedura descritta per il saggio con effluente (cfr. par. 4).

6. Validità del saggio

Il risultato del saggio è considerato accettabile se la sopravvivenza degli organismi di controllo è ≥90% e se la concentrazione di ossigeno si è mantenuta in tutti i trattamenti a livelli ≥60% del valore di saturazione.
Pur senza vincolare la validità del risultato, si consiglia la conduzione periodica di saggi in condizioni standard con un tossico di riferimento, quale ad esempio il bicromato di potassio o il pentaclorofenolo. Questa pratica dovrebbe consentire di evidenziare condizioni sperimentali o lotti di organismi, per qualche motivo, anomali. In condizioni normali, disponendo di una congrua serie di LC_{50}, il risultato di ogni nuovo saggio di riferimento dovrebbe collocarsi entro l'intervallo definito dal valore medio di tale serie e dal doppio del corrispondente scarto tipo (media±2·scarto tipo). Viceversa, se la LC_{50} del tossico di riferimento si colloca all'esterno di questo intervallo di sicurezza, tutti i dati ottenuti con il medesimo lotto di organismi dovrebbero essere considerati con cautela.
A scopo puramente informativo, si possono citare i risultati di alcuni studi condotti sul saggio acuto con *M. bahia*, tra cui quelli di un esercizio di intercalibrazione (US EPA, 1985). A quest'ultimo parteciparono 6 laboratori che, operando sia in condizioni statiche che in flusso continuo, saggiarono la tossicità del nitrato di argento e dell'endosulfan. Il coefficiente di variazione risultò, rispettivamente, di 27% e 22% per il primo tossico e di 62% e 58% per il secondo. Per il Cr(VI) è stata determinata una $96hLC_{50}$ di 2,03 mg/L ed una serie di saggi condotti da due laboratori diede complessivamente un valore medio per la 48h LC_{50} di 6 mg/L (n=8) ed un CV di 21,5% (20‰) (Goodfellow e Rue, 1989). Una serie di 8 prove condotte con lo stesso tossico di riferimento ma da un solo laboratorio, diede come $48hLC_{50}$ media il valore di 5,12 mg Cr (VI)/L e come CV 22% (20‰) (Goodfellow e Rue, 1989). Una serie di 13 saggi condotti parimenti da un unico laboratorio ma utilizzando come tossico il Cd, diede come media della $96hLC_{50}$ il valore di 0,346 mg/L e come CV 9% (25°C, 25‰)(US EPA, 1991).
Un più recente esercizio di intercalibrazione cui parteciparono 14 laboratori che utilizzarono KCl come tossico di riferimento, permise di valutare una $96hLC_{50}$ media di 250 mg KCl/L ed un CV di 36% (22°C; 25‰) (US EPA, 1991). Un simile esercizio di intercalibrazione (25°C; 30‰) con lo stesso tossico ma con la partecipazione di un numero ben maggiore di laboratori (n=61) diede come risultati finali 532 mg KCl/L e 30,1%, rispettivamente $48hLC_{50}$ media e coefficiente di variazione (US EPA, 1991).

7. Analisi dei risultati

7.1 Calcolo della LC_{50}

Il saggio per la valutazione della tossicità acuta descritto in questa procedura si propone non solo l'identificazione delle sorgenti di contaminazione capaci di effetti tossici acuti ma anche la quantificazione della loro potenziale tossicità mediante la stima della concentrazione letale al 50% degli organismi (LC_{50}) per un dato tempo di esposizione (24-48 ore). La determinazione della LC_{50} può essere effettuata con diversi metodi la cui applicabilità è in buona parte di-

pendente dal tipo di risultati ottenuti, e più precisamente dal numero di effetti parziali osservati, intermedi cioè tra una mortalità del 100% e una mortalità nulla. La valutazione della LC_{50} dovrebbe basarsi sui risultati relativi ad almeno 5 concentrazioni di campione ed un controllo, sebbene molti metodi di analisi possono essere utilizzati con un numero di dati inferiore. Se la massima concentrazione saggiata ha causato una mortalità inferiore al 50%, non si dovrebbe procedere al calcolo della LC_{50}, il cui valore sarebbe in tal caso poco attendibile. Meglio ripetere il saggio, se possibile, cercando di migliorare la serie delle concentrazioni saggiate. In caso contrario la LC_{50} sarà più correttamente espressa come "maggiore della massima concentrazione sperimentata" (es.: $48hLC_{50}$>80%).
Nel metodo di saggio dedicato alla valutazione della tossicità acuta con *Daphnia magna* (Sezione 8020) sono stati proposti tre diversi metodi, ampiamente validati, atti alla valutazione della LC_{50}. Si tratta del metodo di Litchfield e Wilcoxon, del test binomiale e del metodo probit. Essi sono adeguatamente illustrati nell'ambito del suddetto metodo al quale si rinvia. Infine, è opportuno segnalare che sono disponibili in commercio alcuni programmi per personal computer espressamente dedicati ai diversi metodi di analisi statistica dei risultati tossicologici. A questi prodotti si rinvia.

7.2 Effetti da concentrazione unica

L'esame dei risultati ottenuti saggiando un campione non diluito del corpo idrico è riconducibile alla teoria del confronto tra due campioni. Nel presente schema sperimentale, i decessi osservati nelle repliche del corpo idrico e in quelle del controllo rappresentano le due serie di dati posti a confronto.
Di fatto, se la mortalità degli organismi esposti al corpo idrico supera il valore del 10% e cioè quel limite di decessi accettato come "naturale" in un gruppo di individui di controllo, si può già concludere che il campione contiene inquinanti a concentrazioni tossiche. Tuttavia può essere opportuno dare supporto statistico al risultato del saggio, verificando la cosiddetta ipotesi nulla o zero, e cioè che le medie dei decessi osservati nei due trattamenti siano uguali. Smentire l'ipotesi con un certo grado di probabilità, solitamente P=0,05, equivale a verificare che la mortalità osservata per gli organismi esposti al corpo idrico è significativa.
Il test *"t"* è utilizzato per confrontare i due campioni e, dal momento che vi è un'attesa di contaminazione o di mortalità maggiore per il campione del corpo idrico piuttosto che per il controllo, un test unilaterale è generalmente adeguato. L'applicazione del test *"t"* richiede che le proporzioni di decessi osservati nelle repliche siano distribuite normalmente. Se i dati soddisfano questo requisito è necessario procedere anche alla verifica di omogeneità della varianza dei due gruppi di risultati e solo in caso affermativo è lecito passare all'esame della significatività dei decessi osservati. Se i dati non fossero distribuiti normalmente il problema viene comunemente risolto mediante opportune trasformazioni dei dati stessi. La conversione delle proporzioni di organismi deceduti nella radice quadrata del loro arc sen è la trasformazione più comune. Se non si rivelasse risolutiva è necessario procedere all'esame dei risultati con metodi non parametrici. Se a sua volta, la condizione di omogeneità della varianza non fosse rispettata, il test *"t"* rimane valido ma deve essere applicato in forma modificata. Il valore calcolato per la funzione *"t"* è infine confrontato con il valore critico di *"t"* individuabile in apposite tabelle, in base al numero di gradi di libertà ed al livello di probabilità prescelto. Se il valore di *"t"* calcolato supera il valore tabellare, le due mortalità sono significativamente diverse. Sono disponibili in commercio dei programmi per personal computer che sono espressamente dedicati all'analisi statistica dei risultati tossicologici e possono svolgere tutte le operazioni necessarie. A questi prodotti, pertanto, si rinvia.

APPENDICE

A1- Note sulla sistematica e sulla biologia di *Mysidopsis bahia*

I Misidacei sono piccoli crostacei che popolano le acque marine, estuariali e, con un numero

ridotto di specie, anche le acque dolci. Sono confondibili a prima vista con degli stadi giovanili di gamberi e quindi con i Crostacei Decapodi. Essi appartengono tuttavia, a un diverso superordine, quello dei Peracaridi ed essenzialmente si differenziano dai Decapodi per avere il carapace mai perfettamente aderente a tutti i segmenti toracici, per la presenza nelle femmine di un "marsupio" formato da alcuni oostegiti (porzione setolosa di arti addominali), e per la mancanza di una vera e propria metamorfosi (Cottiglia, 1983). L'ordine dei Misidacei è rappresentato nelle acque nazionali da varie specie. Tra quelle che si possono catturare in ambienti lagunari la più comune è *Mysis slabberi* che unitamente ad altre, come *Diamysis bayrensis*, sostano poco sopra il substrato o in rapporto con questo, potendo rappresentare una frazione notevole del popolamento planctonico solo nelle ore notturne di intensa attività natatoria (Cottiglia, 1983). La riproduzione avviene in primavera ed estate. I Misidacei costituiscono negli ambienti estuariali e marini un importante anello della catena trofica essendo predati da numerose specie di pesci, spesso di valore commerciale.
M. bahia è una specie estuariale che si riscontra principalmente in acque con salinità superiori al 15‰. È originaria della costa atlantica dell'America del nord e del Golfo del Messico in particolare.
Similmente agli organismi del genere *Daphnia*, anche in *Mysidopsis* gli stadi giovanili si sono spesso dimostrati come i più sensibili alle sostanze tossiche. Quando i giovani schiudono e abbandonano la camera di incubazione a marsupio, sono immobili. Essi conducono vita planctonica per le prime 24-48 ore, dopo le quali raggiungono il fondo, si orientano verso la corrente e si cibano di detrito e di piccoli organismi che da questa sono trasportati.
Gli individui adulti di *M. bahia* hanno lunghezza compresa tra 4,4 e 9,4 mm misurata dal margine anteriore del carapace sino al termine degli uropodi con aspetto laminare (Fig. 1). Le femmine adulte sono normalmente di dimensioni maggiori dei maschi ed i loro pleopodi (appendici addominali) hanno dimensioni minori (Fig. 2). Il corpo è solitamente trasparente ma può presentare colorazioni tendenti al giallo, bruno o nero.

A2 - Allevamento degli organismi

Per ottenere un rifornimento adeguato dei giovani individui per i saggi, la coltura di *M. bahia* deve essere attivata almeno quattro settimane prima del periodo di utilizzo. Gli organismi necessari ad iniziare la coltura di laboratorio devono provenire da centri specializzati che ne garantiscano l'identità specifica. Sono trasportabili in bottiglie di polietilene ad una densità consigliata di circa 50 individui in 700 mL di acqua di mare, in contenitore da 1 L. Per evitare crescite batteriche ed eccessive riduzioni dell'ossigeno disciolto, durante il trasporto che non deve prolungarsi oltre le 24 ore, gli animali non vengono alimentati e si area a saturazione il mezzo acquoso prima della loro immissione.
Le colture massive possono essere mantenute sia in flusso continuo che in sistemi chiusi provvisti di ricircolo del mezzo acquoso. Quest'ultima soluzione è probabilmente la più diffusa.
Il sistema di mantenimento dovrebbe consistere di almeno 3-4 vasche di circa 200 L ciascuna. Tuttavia, possono essere utilizzate anche vasche più piccole aventi un volume di circa 80-100 L. Disporre di più di un'unità di mantenimento tutela dal rischio di perdere l'organismo in caso di possibili incidenti e garantisce un adeguato numero di individui per la sperimentazione. L'intensità della luce ed il fotoperiodo non sembrano avere un ruolo chiave su accrescimento e riproduzione. Sono adottabili, pertanto, intensità luminose comprese tra 500 e 1000 lux con l'alternanza di 16 ore di luce e 8 ore di buio, e cioè quei valori già impiegati con successo per l'allevamento in laboratorio di altri organismi acquatici. *M. bahia* non sopravvive per lunghi periodi a concentrazioni di ossigeno disciolto inferiori a 5 mg/L.
Se l'ossigeno disciolto approssima tali valori è necessario aerare le vasche di allevamento con diffusori a pietra porosa ed aria priva di contaminanti. Gli acquari devono essere prowisti sia di un tipo di filtro interno, posizionato sotto lo strato di ghiaietto (dolomite) con cui si copre il fondo detto "filtro sotto sabbia", che di una unità filtrante esterna alla vasca la cui pompa deve essere dimensionata in modo da garantire un flusso orario minimo pari ad almeno il volume dell'acquario (nell'arco di un'ora tutta l'acqua contenuta nell'acquario deve essere stata trattata dall'unità di filtrazione). Tra i vari materiali di riempimento impiegati nell'unità filtrante esterna (carbone, fibre sintetiche ecc.) si consiglia di includere uno strato di sbriciolato

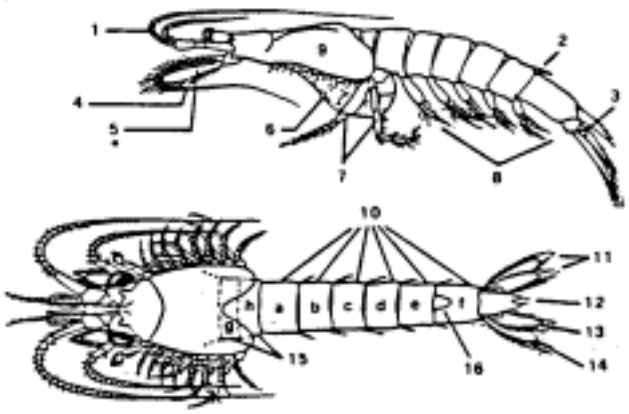


Figura 1: Visione laterale e dorsale di un misidaceo (modificata da US EPA, 1991). 1: antennula; 2: processo dorsale; 3: statocisti; 4: antenna; 5: lamina dell'antenna; 6: marsupio; 7: ottavo arto toracico; 8: pleopodi; 9: carapace; 10: segmenti addominali; 11: uropode; 12: telson; 13: endopodite; 14: esopodite; 15: segmenti toracici; 16: processo dorsale.

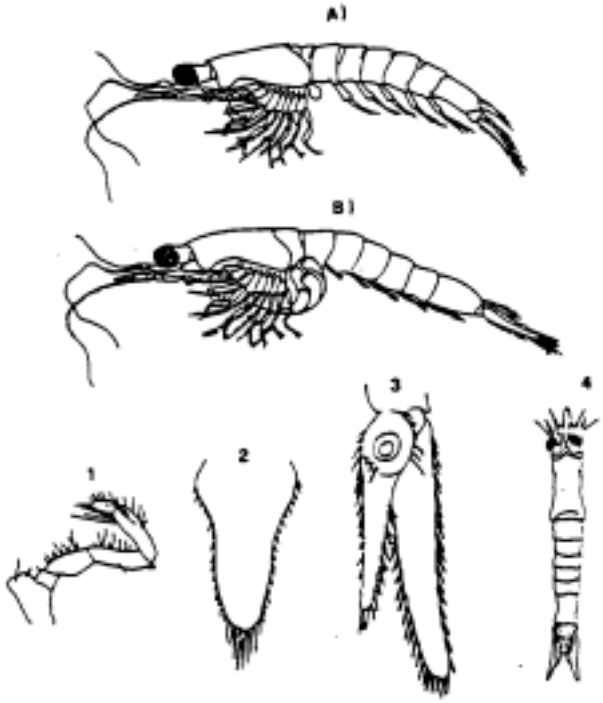


Figura 2.: Principali caratteristiche morfologiche utili all'identificazione di Mysidopsis bahia. a: maschio; b: femmina, si noti la sacca ventrale a marsupio e la minore lunghezza dei suoi pleopodi rispetto a quelli del maschio; c: secondo arto toracico; d: telson; e: uropode destro con statocisti, visto dal dorso, si notino le tre spine sull'endopodite; f: visione dorsale di individuo maschio.

di conchiglie, reperibile in commercio, che sciogliendosi lentamente contribuisce al potere tampone del mezzo acquoso.
Il flusso di ritorno dal filtro esterno dovrà formare una corrente moderata all'interno della vasca rispetto alla quale gli organismi, che sono caratterizzati da una reotassia positiva, possono orientarsi. L'azione dei filtri non si deve affatto limitare alla rimozione meccanica del materiale in sospensione ma deve estendersi, aspetto ben più importante, alla depurazione dei ca-

taboliti disciolti. Affinchè le unità filtranti siano in grado di svolgere questa funzione è necessario un periodo di condizionamento. Si possono aggiungere a giorni alterni alcuni mL di sospensione concentrata di artemie alla vasca da condizionare, almeno fino a che i nitriti non raggiungono la concentrazione di 2 mg/L. Essa continuerà ad aumentare senza ulteriori aggiunte di artemie per poi diminuire lentamente fino a valori inferiori a 0,05 mg/L. A questo punto si può riprendere la somministrazione dei piccoli crostacei o comunque di materiale organico facilmente degradabile e verificare che la concentrazione di nitriti, misurata giornalmente, non subisca incrementi significativi. Se l'unità accetta l'aggiunta di artemie o altro materiale organico senza sostanziali mutamenti del contenuto di nitriti, il condizionamento è compiuto. Si possono quindi introdurre alcuni organismi adulti di *M. bahia*, non più di una ventina. L'assenza di decessi nell'arco di 96 h conferma la raggiunta funzionalità dell'unità di allevamento. L'aggiunta di alcuni litri di acqua o di parte del materiale filtrante proveniente da un'unità già operativa, può abbreviare notevolmente il processo di condizionamento descritto.

A3 - Acqua di allevamento

Una fonte di acqua di mare non contaminata e filtrata (0,45 μm) dovrebbe essere usata per l'allevamento di *M. bahia*, tuttavia, alcune miscele artificiali di sali sono state utilizzate con pieno successo come ad esempio quella commercializzata come Forty Fathoms®. Se si utilizza quest'ultima soluzione, è importante attenersi alle istruzioni fornite con le confezioni di sali che verranno solubilizzati in acqua ultrapura, deionizzata di buona qualità o equivalenti, in contenitori dedicati a questo scopo e non direttamente nelle vasche di coltura. Prima dell'impiego è preferibile che l'acqua sintetica sia aerata moderatamente per 24 ore e lasciata in quiete per alcuni giorni. Per la coltura degli organismi si può adottare una salinità compresa tra 20 e 30‰, ed è consigliato il valore di 25‰. È da preferire una salinità più bassa, ma pur sempre ≥20‰, se si prevede che larga parte dei saggi sarà condotta con salinità inferiori al 25‰.
Come già accennato, un processo molto importante nell'allevamento di organismi in sistemi chiusi è la conversione dell'ammoniaca in nitriti e di questi in nitrati per azione dei batteri nitrificanti. Per la corretta conduzione dell'allevamento di *M. bahia* le concentrazioni da non superare sono pari, indicativamente, a 0,05-0,1 mg/L di NH_3 totale, 0,05 mg NO_2/L e 20 mg NO_3/L (US EPA, 1988; Lussier et al., 1988). Alcuni prodotti distribuiti come kit colorimetrici si prestano ad un pratico controllo di routine di questi parametri.
La rimozione di ammoniaca e nitriti ad opera dei batteri comporta una riduzione del valore di pH e quindi una diminuzione del potere tampone del mezzo acquoso. Questo viene comunemente ripristinato con aggiunta di Na_2CO_3 o $NaHCO_3$. L'aggiunta non deve essere tuttavia indiscriminata in quanto elevati valori di alcalinità possono danneggiare l'attività riproduttiva. Gli interventi correttivi per pH e alcalinità, devono essere dimensionati in modo che il valore di quest'ultima sia compreso tra 90 e 120 mg $CaCO_3$/L (Ward, 1989).
Sebbene sia stata osservata una buona attività riproduttiva anche con pH 7,5, si raccomanda di mantenere valori superiori a pH 7,8 ricorrendo all'impiego controllato di $NaHCO_3$ e rinnovi frequenti del mezzo. Valori di pH compresi nell'intervallo 8±0,2-0,3 sono da considerare ottimali, e si consiglia il rinnovo settimanale del 20-30% dell'acqua delle vasche.

A4 - Alimentazione

I Misidacei sono onnivori (Lussier et al., 1989), in quanto oltre alla cattura di copepodi o di altri organismi dello zooplancton, sono in grado di filtrare alghe e di cibarsi del detrito organico, integrando pertanto la dieta in vario modo. È stato osservato che in corrispondenza della abbondante crescita di diatomee che caratterizza solitamente una vasca dopo varie settimane di funzionamento, si verifica anche un evidente aumento del numero di giovani di *M. bahia*, i quali apparentemente si nutrono nel o del feltro di alghe che riveste le pareti e che, pertanto, non dovrebbe mai essere rimosso completamente nei periodici interventi di pulizia. Alcune diatomee del genere *Skeletonema* sono state somministrate come integratore della dieta, ed il rotifero *Brachionus plicatilis* si è dimostrato, a sua volta, una ottima fonte di cibo per i giovani di *M. bahia* (Lussier et al., 1989).

La frequente somministrazione di cibo vivo è assolutamente necessaria per prevenire fenomeni di cannibalismo. I naupli di Artemia salina si prestano ottimamente a questo scopo. Almeno una volta al giorno i misidacei devono essere nutriti con naupli vivi di *A. salina*. La quantità di artemie deve essere tale da assicurare che nelle vasche ve ne siano sempre presenti per evitare che gli adulti di *M. bahia* predino la propria prole o gli altri individui della vasca. Sono state utilizzate con successo quantità di cibo pari a 2-3 artemie per mL di acqua o anche pari a 150 artemie per individuo ogni giorno. Se, come è consigliabile, si somministra il cibo due volte al giorno, si dimezza il numero di artemie fornite (circa 75/individuo). Viceversa se dopo poche ore non restassero naupli nella vasca è preferibile aumentarne la quantità, adeguandola alla densità ed alla velocità riproduttiva della coltura. L'incremento della quantità di cibo non deve causare tuttavia la riduzione della concentrazione dell'ossigeno disciolto, nè intorbidamento da crescite batteriche diffuse o altri eventi che indichino il decadimento della qualità dell'ambiente di allevamento. È altresì importante controllare che l'unità di filtrazione non abbia un flusso tale da rimuovere essa stessa i naupli di artemia prima che questi possano essere predati.

A5 - Idoneità della dieta

In particolari condizioni ambientali *A. salina* produce delle uova (cisti) quiescenti che permangono vitali per lunghi periodi di tempo, purchè conservate all'asciutto e in condizioni anaerobie (ASTM, 1992). La resistenza dello stadio quiescente fa sì che esso possa essere facilmente trasportato e commercializzato e grazie alla sua praticità, venire ampiamente utilizzato in acquacoltura e in acquariologia per nutrire molti organismi acquatici. Reidratando le cisti in acqua di mare dopo circa 24 ore si schiudono i naupli al primo stadio di sviluppo. Le varietà geografiche e le corrispondenti fonti commerciali di uova di *Artemia* sono numerose; tuttavia è stato osservato che il contenuto di contaminanti, le dimensioni del nauplio e la composizione in acidi grassi, differiscono ampiamente, influendo sulla idoneità del prodotto quale fonte di cibo (Ward, 1987; ASTM, 1992). Le cisti provenienti dal Brasile o dalla Columbia si sono dimostrate idonee sia per la modesta contaminazione che per le dimensioni adeguatamente ridone delle giovani larve (US EPA, 1988). Anche altre aree di provenienza possono comunque rivelarsi adeguate, ma in ogni caso, l'unico modo di valutare l'accettabilità di una varietà di cisti è di condurre prove di alimentazione grazie alle quali si possono esaminare gli effetti su sopravvivenza, crescita e attività riproduttiva di *M. bahia*. Analogamente, anche se il fornitore rimane lo stesso, è necessario che ciascun nuovo lotto di cisti venga saggiato per verificarne l'idoneità. In entrambi i casi si procede come segue: si conducono in parallelo due saggi cronici di 7 giorni, per ciascuno dei quali sono utilizzate 8 repliche di 5 organismi ognuna. Il primo gruppo di 40 misidacei viene alimentato con i naupli di *Artemia* giudicati a suo tempo idonei e che hanno pertanto valore di riferimento, il secondo gruppo viene invece nutrito con i naupli schiusi dal lotto in esame. La frequenza di somministrazione del cibo, la sua quantità, il volume dei recipienti e dell'acqua di mare in essi contenuta e tutto quanto caratterizza il saggio non deve essere modificato rispetto alla procedura di saggio cronico. La nuova fonte di cibo viene considerata idonea se non si osservano differenze statisticamente significative tra i due trattamenti relativamente a sopravvivenza, crescita e riproduzione. Ogni nuovo lotto dovrebbe anche essere analizzato per il contenuto di pesticidi organoclorurati e PCB. Se questi superano complessivamente la concentrazione di 0,3 μg/g (peso fresco), le cisti di *Artemia* non dovrebbero essere utilizzate (US EPA, 1988). È quindi buona norma effettuare le necessarie analisi su un piccolo quantitativo di cisti e, nel caso si ottengano i risultati attesi, si può procedere all'acquisto di un lotto di notevoli dimensioni che potrà servire per diversi anni (ASTM, 1992).

A6 - Preparazione della dieta

Un imbuto separatore con un volume di 2 L costituisce un pratico contenitore per la schiusa delle cisti. Si utilizza 1 L di acqua di mare naturale o sintetica ma anche una soluzione contenente 35 g di NaCl si presta allo scopo. Si aggiungono 10 mL di cisti di *Artemia* e si area intensamente con un tubetto di vetro posizionato in modo che la sua estremità sia sul fondo

dell'imbuto. Il tempo di schiusa varia in relazione all'area geografica di provenienza e alla temperatura di incubazione. Tuttavia, con una temperatura di 27°C le uova dovrebbero schiudere in circa 24 ore. Dopo tale periodo si arresta l'aerazione e i gusci ormai vuoti si portano in superficie mentre i naupli si raccolgono sul fondo dal quale vengono prelevati mediante apertura del rubinetto dell'imbuto. Sfruttando la fototassia positiva delle larve, la raccolta può essere agevolata oscurando la parte superiore dell'imbuto. Tale operazione non deve protrarsi oltre i 5-10 minuti in quanto, l'elevata concentrazione di organismi raggiunta sul fondo del contenitore fa sì che, sospeso il gorgogliamento, l'ossigeno disciolto venga rapidamente esaurito provocando la morte dei naupli. L'apertura alternata del rubinetto dell'imbuto separatore consente di rimuovere a più riprese i naupli appena schiusi. Questi verrano filtrati e se necessario risciacquati o concentrati in mezzo fresco con l'aiuto di un contenitore col fondo di rete (maglie di 150 μm).
Il nauplio di artemia è incapace di nutrirsi di fonti di cibo esterne per un periodo di circa 24 ore dalla schiusa (25°C), durante le quali utilizza le riserve di tuorlo di cui è provvisto. In questo arco di tempo il valore nutrizionale e calorico del nauplio decadono progressivamente, e pertanto si consiglia di utilizzarlo subito dopo la schiusa o comunque entro le 2-6 ore dal T_{90}, e cioè da quando il 90% delle cisti è schiuso (ASTM, 1992). Grazie alla ripetibilità del tempo necessario alla schiusa delle numerose varietà di *Artemia* (a temperatura costante), l'idratazione delle cisti può essere effettuata in base al momento giudicato più opportuno per la raccolta e la somministrazione dei naupli appena schiusi. A parità di altre caratteristiche tossicologiche e nutrizionali, la ridotta dimensione del nauplio deve costituire il criterio guida nella scelta della fonte commerciale di *A. salina*, pena l'impossibilità per i giovani di *M. bahia* di catturare la preda e quindi di nutrirsi adeguatamente (Lussier et al., 1988).
La necessità di fornire cibo vivo quotidianamente all'allevamento dei misidacei, può rendere utile l'impiego di sistemi automatizzati che, in assenza del personale tecnico (fine settimana), idratano le cisti di *Artemia* e somministrano i naupli alle vasche. In breve, si tratta di congegni artigianali, nei quali un temporizzatore controlla il deflusso, per gravità, di un certo volume di acqua di mare al contenitore con le cisti da idratare, e similmente, dei naupli alla vasca, quando la schiusa è completata (Schimmel e Hansen,1975; Ward, 1984).

A7 - Riproduzione

Nelle colture di laboratorio *M. bahia* raggiunge la maturità sessuale in 12-20 giorni in relazione alla temperatura dell'acqua ed alla dieta. A differenza di quanto accade nei generi *Daphnia* o *Ceriodaphnia* le uova non si sviluppano se non fecondate. L'accoppiamento ha luogo di notte e dura pochi minuti. Affinchè si abbia un'attività riproduttiva soddisfacente la temperatura delle vasche di allevamento deve essere mantenuta tra 24 e 26°C. Normalmente le uova sono presenti negli ovari delle femmine a circa 12 giorni dalla schiusa (Fig. 3) e la camera di incubazione a marsupio è completamente sviluppata negli organismi di circa 15 giorni di età, corrispondenti a circa 5 mm di lunghezza corporea (Fig. 4).
I neonati sono liberati a 17-20 giorni. Il numero di uova deposte nel marsupio ed il numero dei giovani prodotti per ogni schiusa dipende in modo diretto dalle condizioni ambientali e dalle dimensioni della femmina che ha una schiusa ogni 4-7 giorni. Femmine adulte (8-9 mm) mantenute in acqua naturale o sintetica (Forty Fathoms®) producono mediamente 11±6 larve allo stadio III (l'ultimo prima della nascita).
L'attività riproduttiva dei misidacei può risultare inibita se nelle vasche si raggiungono condizioni di sovraffollamento. Pertanto, fatta eccezione per i periodi di massima necessità di neonati, è opportuno rimuovere con cadenza regolare una parte degli individui presenti nelle vasche. Il valore di densità consigliato non deve superare i 20 misidacei/L, pena l'inibizione dell'attività riproduttiva.
Tuttavia, al fine di un corretto dimensionamento della coltura, è opportuno considerare anche l'ampiezza del fondo della vasca e non solo il suo volume.

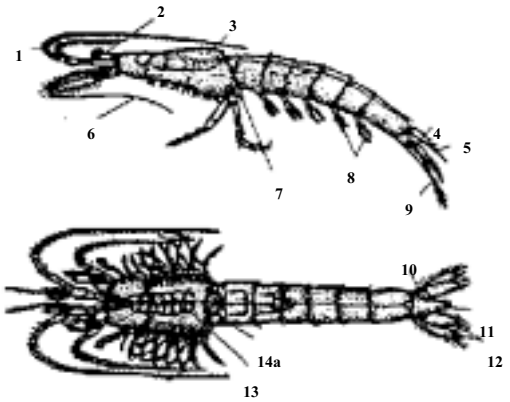


Figura 3: Femmina adulta di M. bahia con uova in sviluppo negli ovidotti (modificata da Lussier et al., 1987). 1: antennula; 2: occhio peduncolato; 3: carapace; 4: statocisti; 5: telson; 6: antenna; 7: marsupio in sviluppo; 8: pleopodi; 9: uropode; 10: statocisti; 11: telson; 12: uropodi; 13: ovidotti con uova; 14a: marsupio in sviluppo.

A causa della abitudine parzialmente bentonica dell'organismo, è stato infatti proposto che ogni individuo abbia a disposizione circa 30 cm di superficie (ASTM, 1996). Il popolamento lasciato ad evoluzione spontanea è caratterizzato da una crescente dominanza numerica degli individui di sesso maschile. È quindi consigliabile controllare la densità di questi ultimi piuttosto che dell'intero popolamento in modo indiscriminato, favorendo un rapporto tra i sessi di circa 2:1 (femmine:maschi). La continua raccolta di giovani individui è fonte di stress per la coltura di *M. bahia* e ciò è dovuto fondamentalmente alla frequente manipolazione degli organismi. Anche per questo motivo è preferibile mantenere contemporaneamente più vasche. Alternando la raccolta degli individui necessari ai saggi si permette alle colture non in uso di beneficiare di un periodo di ripresa. Se la frequenza dei saggi impone una continua richiesta di larve, è opportuno mantenere indicativamente almeno quattro vasche da 200 L ciascuna.

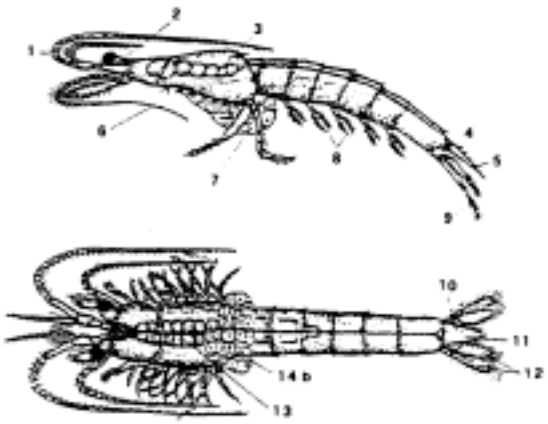


Figura 4: Femmina adulta di M. bahia con uova negli ovidotti ed embrioni in sviluppo nella sacca a marsupio (modificata da Lussier et al., 1987). 1: antennula; 2: occhio peduncolato; 3: carapace; 4: statocisti; 5: telson; 6: antenna; 7: marsupio con embrioni; 8: pleopodi; 9: uropode; 10 statocisti; 11: telson; 12: uropodi; 13: ovidotti con uova; 14b: marsupio con embrioni.

La registrazione dei dati di produttività di ciascuna coltura permetterà di decidere il momento in cui la coltura potrà essere scartata. Spesso, dopo tre o più mesi, la coltura può entrare in fase di senescenza e la produzione di larve risultare pressochè annullata. Al contrario,

quando tutte le condizioni sono favorevoli, più della metà delle femmine adulte dovrebbe avere delle uova nella camera di incubazione (ASTM, 1990).
È opportuno non attendere la fase di senescenza, ma garantire la continuità dell'allevamento allestendo nuove vasche con organismi (50-100, per vasche fino a 100 L) prelevati da colture in attiva fase riproduttiva, meglio se da colture diverse, al fine di favorire l'eterogeneità del patrimonio genetico. A tale scopo la periodica introduzione di organismi provenienti da altri allevamenti o meglio, da più popolazioni naturali, è fortemente raccomandata. Gli individui di *M. bahia* ottenuti da fonti esterne, devono essere mantenuti separati dall'allevamento ed in osservazione per un paio di settimane, onde minimizzare il rischio di introdurre degli agenti patogeni. Nelle operazioni di trasferimento, gli organismi non devono essere esposti a cambiamenti di salinità e di temperatura che siano superiori, rispettivamente, a 2-3‰ e a 2-3°C in 24 ore.

A8 - Pulizia e disinfezione

Quando una vasca è in funzione da alcuni mesi, anche se mantenuta correttamente, evidenzia un accumulo di materiale organico (artemie non consumate, metabolismo di *M. bahia* e crescita di organismi sulle superfici sommerse della vasca). La pulizia periodica per sifonamento, che si può far coincidere con i rinnovi parziali dell'acqua di coltura, verrà sostituita in questo caso da un riallestimento della vasca che prevede il risciacquo della ghiaia e dei supporti filtranti e il rinnovo totale dell'acqua di mare (adeguatamente condizionata se artificiale). È da escludere l'uso di detergenti e di disinfettanti se non dopo morie, eventi patologici o la comparsa di idrozoi nelle vasche di coltura. In questo caso è necessario scartare i misidacei che presentino dei polipi sul corpo, mentre gli acquari dovranno essere accuratamente lavati con detergenti e acqua calda. A ciò si farà seguire un trattamento con acido (10% HCl) e numerosi risciacqui con acqua deionizzata.

A9 - Organismi per il saggio

Diverse sono le soluzioni per ottenere le giovani larve necessarie al saggio. Se è richiesto un controllo accurato dell'età degli organismi, è preferibile isolare delle femmine adulte di *M. bahia* con l'anticipo, rispetto all'allestimento del saggio, dettato dalla procedura metodologica. In questo caso, con l'aiuto di un retino con maglie di 2 mm, che trattenga cioè solo gli adulti, si isola nella vasca di coltura un gruppo di organismi dal quale vengono prelevate quelle femmine gravide le cui uova mostrino la macchia oculare degli embrioni in sviluppo. Con una pipetta ad ampio diametro (4-5 mm) e provvista di bulbo elastico per l'aspirazione, si trasferiscono le femmine prescelte in un bicchiere (4 L), con il fondo di rete (12 mm), a sua volta sospeso in un imbuto separatore a bocca larga (Fig. 5). Grazie a questo dispositivo i neonati appena schiusi cadono attraverso la rete nell'imbuto sottostante dal quale, aprendo il rubinetto potranno venire raccolti in un cristallizzatore o in un recipiente provvisto a sua volta di un fondo di rete (300 μm), utile per concentrare o risciacquare gli organismi.
Un'altra soluzione simile alla precedente, consiste nel trasferire le femmine gravide in un ampio retino (maglia di 2-3 mm), del tipo usato in acquariologia, che è mantenuto sospeso in una vasca di 8 L contenente almeno 4 L di acqua. In entrambi i casi, gli adulti vengono nutriti un paio di volte al giorno con naupli di *A. salina* secondo i criteri già descritti. Generalmente è necessario aerare le vasche di schiusa, sia per mantenere la concentrazione di ossigeno disciolto al di sopra del 60% della saturazione e sia per mantenere il cibo in sospensione. I neonati schiusi nell'arco di 24 ore dall'isolamento delle femmine hanno età ≤24 ore, e possono essere usati per i saggi di tossicità acuta fino al compimento del quinto giorno di età. Il numero di femmine gravide da isolare può essere conteggiato adottando una stima prudenziale di un adulto ogni due neonati richiesti. Al fine di accelerare il rilascio della prole, può essere vantaggioso mantenere nelle camere di schiusa una temperatura leggermente più elevata rispetto a quella di allevamento, preferendo valori di 26-27°C. Dopo un massimo di 48 ore di permanenza nella camera di schiusa, le femmine vengono riportate alla vasca di coltura massiva. Si possono citare altre due tecniche per ottenere i neonati necessari al saggio, anche se offrono minori garanzie sull'età degli organismi, rispetto alle due precedenti.

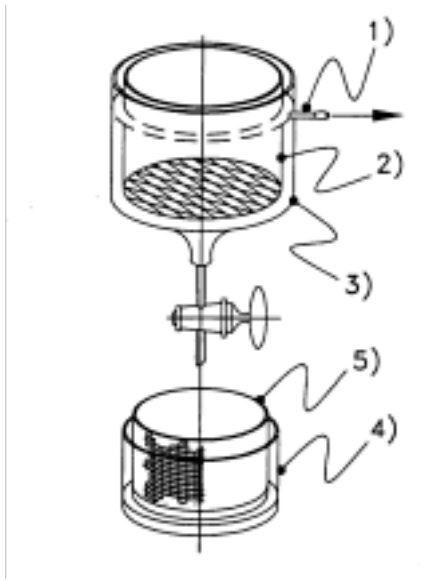


Figura 5: Dispositivo per l'isolamento di femmine gravide e la raccolta di neonati (modificata da Lussier et al., 1987). 1: deflusso; 2: bicchiere con fondo di rete; 3: imbuto separatore; 4: cristallizzatore; 5: recipiente con fondo e pareti di rete.

La prima, descritta da Neitsema e Neff (1980) o anche da Lussier et al. (1988), consiste nell'applicazione di una sorta di aspiratore per sifonamento, ad una vasca di allevamento. Il retino posto sulla presa di questo sifone, ha maglie tali da escludere gli individui adulti, che pertanto non vengono rimossi dalla vasca, permettendo invece la raccolta dei soli stadi giovanili. Questo sistema, che talvolta è indicato come "mysid generator", mette a disposizione, giornalmente, un certo numero di neonati, raccolti in una apposita camera esterna alla vasca di allevamento.
Il secondo metodo per ottenere dei giovani esemplari di *M. bahia*, consiste, semplicemente, nel prelevare con un retino un gruppo di organismi dalla vasca di allevamento, trasferirli ad un cristallizzatore (2 L) e con l'aiuto di un piano luminoso e di un reticolo con quadrati da 2 mm, selezionare quegli individui aventi lunghezza inferiore a 2 mm, che dovrebbero avere un'età di circa 24 ore.
Se non usati immediatamente, i neonati di *M. bahia* vengono mantenuti in una vasca di dimensione adeguata al loro numero e nutriti secondo i criteri già esposti. A questo scopo si utilizzano generalmente vasche di volume ridotto (10-20 L), mantenute in aerazione moderata, con un ricambio di almeno il 50% del mezzo ogni 48 ore. Questo periodo di mantenimento, che è fissato in un tempo massimo di cinque giorni dalla schiusa, può essere utilizzato per completare l'acclimatazione degli organismi alle condizioni di saggio.

BIBLIOGRAFIA

ASTM (1990): "*Standard guide for conducting lifecycle toxicity tests with saltwater Mysids*", American Society for Testing and Materials, ASTM E 1191 -90.

ASTM (1992): "*Standard practice for using brine shrimp nauplii as food for test animals in aquatic toxicology*", American Society for Testing and Materials, ASTM E 1203-92.

ASTM (1996): "*Standard guide for conducting lifecycle toxicity tests with saltwater Mysids*", American Society for Testing and Materials, ASTM E 1191-90 (Revision).

COTTIGLIA M. (1983): "*Crostacei Decapodi lagunari. Guide per il riconoscimento delle spe-*

cie animali delle acque lagunari e costiere italiane", in Guide per il riconoscimento delle specie animali nelle acque interne italiane, CNR, P. F. "Promozione della Qualità dell'Ambiente". n.10, AQ/1/1225, pp. 149.

GOODFELLOW W.L. & RUE W.J. (1989): "Evaluation of a chronic estimation toxicity test using Mysidopsis bahia", in *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment*, 12th vol. ASTM STP 1027, U.M. Cowgill and L.R. Williams, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 333-344.

LUSSIER S.M., KUHN A. & SEWALL J. (1987): "Guidance manual for conducting seven day mysid survival/growth/reproduction study using the estuarine mysid, *Mysidopsis bahia*", Contribution No. X106, in: Schmmel, S.C., ed. "*Users guide to the conduct and interpretation of complex effuent toxicity tests at estuarine/marine sites*", Environmental Research Laboratory, U. S. Environmental Protection Agency, Narragansett, Rhode Island. Contribution No. 796, 265 pp.

LUSSIER S.M., KUHN A., CHAMMAS M.J. & SEWALL J. (1988): "Techniques for the laboratory culture of Mysidopsis species (Crustacea: Mysidacea)", *Environ. Toxicol. Chem.*, **7**, 969-977.

REITSEMA L.A. & NEFF J.M. (1980): "A recirculating artificial seawater system for the laboratory culture of Mysidopsis bahia (Crustacea; Pericaridea)", *Estuaries*, **3**, 321-323.

RICHARDS F.A. & CORWIN N. (1956): "Some oceanographic applications of recent determinations of the solubility of oxygen in seawater", *Limnol. Oceanogr.*, **1**, 263-267.

SCHIMMEL S.C. & HANSEN D.J. (1975): "An automatic brine shrimp feeder for aquatic bioassays", *J. Fish. Res. Board Can.*, **32**, 314-316.

US EPA (1985): "*Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms*", W.H. Peltier C.I. Weber, U.S. Environmental Protection Agency, Report EPA/600/485/013, Cincinnati, OH.

US EPA (1988): "Mysid (Mysidopsis bahia) survival, growth and fecundity tests", Method 1007, in *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms*, C.I. Weber, W.B. Horning, D.J. Klemm, T.W. Neiheisel, P.A. Lewis, E.L. Robinson, J. Menkedick e F. Kessler, eds. EMSL, US Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, EPA-600/4-87-028.

US EPA (1991): "*Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms*", C.I. Weber, U.S. Environmental Protection Agency, Report EPA/600/4-90/027, Cincinnati, OH.

WARD S.H. (1984): "A system for laboratory rearing of the mysid, Mysidopsis bahia Molenock", *Progr. Fish Cult.* **46**, 170-175.

WARD S.H. (1987): "Feeding response of the Mysid-Mysidopsis bahia reared on Artemia", *Progr. Fish Cult.* **49**, 29-33.

WARD S.H. (1989): "The requirements for a balanced medium in toxicological experiments using Mysidopsis bahia with special reference to calcium carbonate", in *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment*, 12th vol. ASTM STP 1027. U.M. Cowgill and L.R. Williams eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 402-412.

8060. Metodo di valutazione della tossicità acuta con *Artemia sp.*

1. Principio del metodo

Il metodo consente di valutare la tossicità acuta di campioni acquosi o di estratti provenienti o afferenti a corpi idrici marini o salmastri utilizzando come risposta l'immobilizzazione del crostaceo marino *Artemia sp.*.
Naupli schiusi da cisti durature e allo stadio larvale II-III di *Artemia sp.* (artemia, crostaceo anostraco) vengono utilizzati per un saggio a 24-96 ore per la determinazione dell'EC_{50}, dell'EC_{20} e della diluizione di non effetto.

2. Campo di applicazione

Il metodo può essere utilizzato per valutare gli effetti tossici acuti di campioni di scarichi afferenti in acque salmastre, marine o a salinità superiore a quella di mare, di campioni di acqua superficiale salmastra, marina o a salinità superiore a quella di mare, di eluati di fanghi provenienti dal dragaggio di aree portuali o da interventi di perforazione e assimilabili, di eluati o estratti di sedimenti marini, di eluati di materiali utilizzati per il ripascimento di litorali e assimilabili e di sostanze pure.

3. Interferenze e cause di errore

Sostanze volatili o scarsamente solubili in acqua, composti che possono reagire con l'acqua di diluizione del saggio o che si possono alterare durante le prove, possono influenzare l'attendibilità del risultato ottenuto.
Valori di pH inferiori a 6,5 o superiori a 8,5 così come valori di salinità inferiori a 5‰ o superiori a 50‰ possono influire sulla sopravvivenza delle artemie, inibendone le funzioni vitali.
Anche uno scarso contenuto in ossigeno disciolto del campione (inferiore al 40% di saturazione) può interferire con il risultato del saggio.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento deve essere effettuato in accordo con quanto previsto dalla Sezione 1030 "Metodi di campionamento". In particolare, nell'esecuzione di test su acque di scarico il volume di campione da prelevare è di circa 10-100 mL a seconda del tipo di saggio. Per eventuali ripetizioni del test, si consiglia tuttavia, di riempire completamente un contenitore da 250 mL in materiale chimicamente inerte (preferibilmente in vetro scuro). Questo accorgimento consente di evitare la perdita di eventuali sostanze volatili dal campione.
Il campione così prelevato deve essere conservato al buio e alla temperatura di 4°C per non più di 72 ore. Per tempi maggiori si consiglia di congelare il campione a -20°C; in quest'ultimo caso tuttavia non è possibile assicurare la totale conservabilità delle caratteristiche del campione ai fini del risultato del saggio.

5. Apparecchiature

5.1 Microscopio stereoscopico da 8-10 ingrandimenti, oppure equivalente lente di ingrandimento; per l'osservazione si consiglia il fondo scuro.

5.2 Incubatore per una temperatura di 25±1°C

5.3 Sistema di illuminazione da 3000-4000 lux al piano di appoggio dei contenitori degli animali.

5.4 Luximetro per misurare l'intensità luminosa.

5.5 pH-metro

5.6 Salinometro

5.7 Misuratore di ossigeno disciolto

5.8 Piastre multi pozzetto monouso da 24 posti, con capacità di 3 mL ciascuno in polistirene per il saggio con le acque di scarico oppure beaker in vetro da 50 mL per i campioni di acque superficiali.

5.9 Piastre Petri in vetro di 5 cm di diametro, con coperchio per la riattivazione delle cisti.

5.10 Micropipette in polietilene o in vetro per il trasferimento delle larve.

5.11 Strisce di parafilm per sigillare i contenitori del saggio.

5.12 Contenitori a tubetto in plastica da 2 mL per la conservazione delle cisti.

5.13 Pipette a volume variabile da 1-5 mL con relativi puntali.

Per l'allevamento delle artemie in laboratorio occorre inoltre:

5.14 Beaker in vetro da 500 mL

5.15 Sistema di areazione a microbolle a bassa portata, fornito di diffusori a pietra porosa del tipo da acquario.

Tutti gli accessori destinati a venire in contatto con l'acqua di allevamento non devono rilasciare sostanze tossiche.

6. Reattivi

6.1 Organismo test

Per il test si possono utilizzare le Reference Artemia Cysts (RAC) disponibili presso la Quality Assurance Research Division, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati OH 45268, U.S.A. oppure presso il Laboratory for Biological Research in Aquatic Pollution, University of Ghent, Belgium. Possono inoltre essere utilizzate cisti di *Artemia sp.* prodotte come indicato nell'Appendice B, previa verifica della loro sansibilità, in termini di 24h EC_{50}, nei confronti dei seguenti composti:

composto	24h EC_{50} (mg/L)
sodio lauril solfato	< 30
$K_2Cr_2O_7$	< 25
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	< 6,5

Inoltre il tempo di schiusa del 90% delle cisti deve esssere inferiore o uguale a 32 ore.
L'organismo utilizzato per il saggio è un nauplio di età inferiore a 48 ore allo stadio larvale II o III (cfr. Appendice A) del crostaceo marino *Artemia sp.*

6.2 Soluzione di allevamento e di diluizione

Per l'allevamento, per la riattivazione delle cisti, per la diluizione dei campioni e come soluzione controllo si possono utilizzare soluzioni ottenute con sali marini già miscelati come l'Instant Ocean® (si sciolgono in un litro d'acqua deionizzata sotto agitazione 35 g di sale marino e, quando necessario, si filtra la soluzione su carta da filtro) oppure si utilizza la soluzione ASPM così preparata:

- NaCl = 26,4 g;
- KCl = 0,84 g;
- $CaCl_2 \cdot H_2O$ = 1,67 g;
- $MgCl \cdot H_2O$ = 4,6 g;
- $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ = 5,58 g;
- $NaHCO_3$ = 0,17 g;
- H_3BO_3 = 0,03 g

I sali indicati vengono sciolti in un litro di acqua deionizzata mantenuta in agitazione.
Le soluzioni così preparate sono stabili per circa 1-2 mesi se mantenute al buio e alla temperatura di 4±1°C. Le soluzioni devono essere portate a temperatura ambiente (20-25°C) prima del loro utilizzo.
Si consiglia di utilizzare la soluzione Instant Ocean® per la riattivazione delle cisti in quanto permette una maggiore efficienza di schiusa e la soluzione ASPM per l'esecuzione del test in quanto garantisce una migliore ripetibilità dei risultati.

7. Procedimento

Prima di condurre il saggio, il campione deve essere portato a temperatura ambiente. Si procede quindi alla misura del pH e della salinità. Nel caso in cui il valore del pH si collochi al di fuori dell'ambito di sopravvivenza dell'organismo (vedi Capitolo 3) si effettua il test sia al pH naturale del campione sia a pH 7,0±0,2, previa aggiunta di NaOH o HCl 1 M. Nel caso in cui il pH del campione sia compreso tra 6,5 e 8,5 unità non è necessario correggere il pH. Per campioni d'acqua di mare, salmastra o a salinità superiore a quella di mare la salinità del campione non va modificata se rientra nell'ambito di sopravvivenza dell'organismo (vedi Capitolo 3).
Per campioni d'acqua di scarico afferenti in acque di mare, il saggio va condotto alla salinità del corpo recettore.

7.1 Riattivazione delle cisti

La riattivazione delle cisti deve avvenire circa 48 ore prima del saggio. A tal fine si versa nella piastra Petri (5 cm di diametro) una quantità di cisti pari a circa 100 mg. Si aggiungono 12 mL della soluzione salina (6.2), si chiude con il coperchio la piastra e la si espone per almeno un'ora a 25±1°C e a 3000-4000 lux di intensità luminosa. Successivamente le cisti vanno incubate al buio alla stessa temperatura, per 24 ore. Il giorno successivo quindi si trasferiscono le larve schiuse in una nuova piastra di Petri riempita con 12 mL di soluzione salina (6.2) e si mantiene tale piastra per altre 24 ore alla stessa temperatura.

7.2 Conduzione del saggio

Varie procedure di conduzione possono essere adottate a seconda che sia noto (saggio definitivo) o no (saggio preliminare) l'ambito di concentrazioni entro cui ci si aspetta di rilevare l'effetto tossico dell'acqua di scarico o degli estratti da analizzare. Per campioni poco tossici o per corpi idrici superficiali si consiglia di adottare la procedura di saggio a 96 ore, mentre per le acque di scarico quella a 24 ore.

7.2.1 Saggio preliminare

Quando sia ignota la tossicità del campione da analizzare occorre procedere saggiando un ampio intervallo di diluizioni. Si consiglia di saggiare, oltre alla soluzione controllo (si utilizza la soluzione diluente 6.2), il campione tal quale e almeno cinque diluizioni successive 1:10 con la soluzione diluente 6.2, pari al 100%, 10%, 1%, 0,1% e 0,01% del campione.
Per ogni singolo test si utilizzano le piastre a 24 posti (6 righe per 4 colonne). Nella prima riga si aggiunge 1 mL della soluzione di controllo, nelle successive righe il campione e le relative diluizioni. Si trasferiscono quindi nella prima colonna, con una pipetta in plastica, una cinquantina di artemie allo stadio larvale II e III prelevate dalla piastra Petri. L'operazione si effettua al binoculare e per facilitarla si consiglia di utilizzare una fonte luminosa in posizione laterale che favorisca l'aggregazione delle artemie sul bordo della piastra. Si trasferiscono quindi nelle colonne 2-3-4 i naupli in numero di 10 per ciascun pozzetto e per un totale di 30 individui per ciascuna diluizione, avendo cura di lavare in acqua deionizzata la pipetta prima di passare da una riga a quella successiva. Si chiude la piastra con uno strato di parafilm e con il coperchio relativo. Si pone in incubatore alla temperatura di 25±1°C per 24 ore al buio.
Il giorno successivo si colloca la piastra al binoculare e si contano gli organismi vivi sul numero totale degli organismi iniziali. Le larve si considerano morte quando rimangono immobili per almeno 10 secondi continui di osservazione. Se la mortalità della soluzione di controllo è superiore al 10% il saggio non è valido.
Al termine della prova preliminare è generalmente possibile individuare un ambito di concentrazioni entro cui procedere per il successivo saggio definitivo. Di norma tale intervallo è compreso tra la concentrazione che causa la completa inibizione della motilità del crostaceo e quella che non inibisce tale attività.

7.2.2 Saggio definitivo a 24 ore

Per campioni di acque di scarico o per campioni molto tossici (cioè con percentuale di inibizione della motilità superiore al 50% alla massima concentrazione saggiata), si può condurre il test con la procedura precedentemente descritta (saggio preliminare), ma con un ambito di concentrazione da saggiare più ristretto (tra 0 e 100% di inibizione). Le concentrazioni scelte per il saggio definitivo devono essere in scala logaritmica in modo da permettere una facile rettificazione della curva di tossicità; per esempio 0,1% - 0,4% - 0,8% - 1,6% di campione.

7.2.3 Saggio definitivo a 96 ore

Per campioni d'acqua raccolti da corpi recettori o per campioni poco tossici (cioè con percentuale di inibizione della motilità inferiore al 50%) è necessario prolungare la durata del saggio a 96 ore.
Dopo la riattivazione delle cisti come descritto in (7.1), 10 naupli allo stadio larvale II-III vengono trasferiti in beaker da 50 mL riempiti con 40 mL di soluzione test. Ciascuna concentrazione viene saggiata in tre repliche. Nel saggio si utilizza la soluzione di controllo (6.2) e cinque diverse concentrazioni per ciascun campione per un totale di 18 beaker. I beaker vanno chiusi con parafilm e tenuti a 25±1°C con un ciclo di illuminazione di 14:10 luce:buio. È necessario alimentare i naupli durante il saggio con qualche goccia di una coltura pura (10^{7-8} cellule/mL) di alghe verdi (vedi Appendice B). Ogni 24 ore dall'inizio del saggio viene registrato il numero di individui vivi sul totale di quelli posti in esperimento.

8. Calcoli

8.1 Percentuale di immobilizzazione

Nell'elaborazione dei dati occorre sommare tutti i dati ottenuti per le diverse repliche in modo da ottenere per ciascuna concentrazione saggiata il numero totale degli individui vivi sul numero totale degli organismi utilizzati (es. morti= 3 + 5 + 4 = 12, organismi utilizzati: 10 x 3 = 30 individui). Per ciascuna concentrazione si divide il numero di individui morti sul totale degli individui utilizzati e si moltiplica per cento. Si ottiene così la percentuale di immobilizzazione.

8.2 Diluizione di non effetto

Il calcolo della diluizione di non effetto viene condotto solamente nel caso di campioni di acque di scarico e comunque non è sostitutivo del calcolo dell'EC_{50}. La diluizione di non effetto per un determinato campione rappresenta la massima concentrazione del campione alla quale si è registrata una percentuale di immobilizzazione inferiore al 20%.
In accordo con alcune osservazioni dell'OECD (1998) e dell'ISO (1999), si ritiene che le informazioni fornite da questa procedura di calcolo debbano essere considerate con estrema cautela, in quanto non sufficientemente validate dal punto di vista statistico.

8.3 - EC_{50} ed EC_{20}

Escludendo gli effetti 0 e 100%, si rappresentano su una carta logaritmo-probabilistica le percentuali di organismi immobilizzati in funzione delle corrispondenti concentrazioni espresse in scala logaritmica. Si traccia la retta che meglio approssima i punti ottenuti privilegiando quelli compresi tra 40 e 60% di effetto. A questo punto si legge sulla retta tracciata a quale concentrazione corrisponde l'effetto tossico atteso (EC_{50} o EC_{20} corrispondenti al 50 e 20% degli individui inibiti).
Un calcolo più preciso dell'EC_{50} o EC_{20} e dei suoi limiti fiduciali può essere effettuato utilizzando il metodo Probit e per il confronto statistico il test del Chi^2 così come riportato per il metodo relativo alla *Daphnia magna* (vedi Sezione 8020).

9. Qualità del dato

Un esercizio di interconfronto, a cui hanno partecipato cinque laboratori italiani qualificati appartenenti ad enti pubblici e privati è stato condotto utilizzando per il saggio le Artemia Reference Cysts (RAC) acquistate presso il Laboratory for Biological Research in Aquatic Pollution, University of Ghent, Belgium.
Sono state utilizzate quali sostanze test il sodiolaurilsolfato, il bicromato di potassio ($K_2Cr_2O_7$) e il solfato di rame ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$). Per ciascuna di queste sostanze è stata determinata l'EC_{50} a 24 ore utilizzando le seguenti concentrazioni :

Sodio lauril solfato	50-28-16-9-5 mg/L
$K_2Cr_2O_7$	50-28-16-9-5 mg/L
$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	15-8,4-4,8-2,7-1,5 mg/L

Ciascun composto è stato saggiato conducendo tre test in parallelo; per ciascun saggio ogni concentrazione è stata saggiata in triplo. Il test di intercalibrazione ha permesso di ottenere per ogni laboratorio un valore medio di EC_{50} a 24 ore. Il saggio è stato condotto seguendo la metodica riportata per le acque di scarico (7.2.2) e utilizzando per la riattivazione e le diluizioni sia la soluzione ASPM che quella Istant Ocean. I risultati ottenuti, sintetizzati in Tab. 1, indicano una precisione, espressa come coefficiente di variazione, compresa tra il 28% e il 52% per la metodica ASPM e tra il 21% e il 64% per la metodica Instant Ocean.

Tabella 1: Risultati dell'esercizio di interconfronto

Laboratori totali	Metodica	sodiolaurilsolfato media	sodiolaurilsolfato scarto tipo	$K_2Cr_2O_2$ media	$K_2Cr_2O_2$ scarto tipo	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ media	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$ scarto tipo
5	ASPM	23,2	6,5	16,0	8,4	4,5	2,0
5	Instant Ocean	25,6	5,5	15,1	9,6	4,5	2,0

BIBLIOGRAFIA

CHIAUDANI G. & VIGHI M. (1978): "Metotodologia standard di saggio algale per lo studio della contaminazione delle acque marine", *Quad. Ist. Ric. Acque*, **41**, 116 pp.

ISO (1999): "*Water Quality – Determination of long term toxicity of substances to Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea)*", *ISO/FDIS 10706.*

OECD (1998) Report of the OECD Workshop on Statistical Analysis of Aquatic Toxicity Data, *ENV/MC/CHEM(98)18.*

APPENDICE A - Biologia dell'organismo

Artemia sp. è un piccolo crostaceo marino euroalino anostraco di 2-3 cm in cui è possibile riconoscere, dal punto di vista morfologico, tre parti: un capo con due antenne e tre occhi di cui uno mediano, un torace con due paia di arti forniti di appendici lamellari e un addome in cui nell'utero della femmina si accumulano uova sferoidali di colore bruno. Nella larva, il nauplius, sono riconoscibili soltanto due parti: una prima, il capo, con un unico occhio mediano, due paia di antenne e due paia di appendici che diverranno le mandibole e una seconda parte senza appendici e non segmentata (Fig. 1).
Il numero di cromosomi del corredo genomico varia ed è pari a 42 nelle forme a riprodu-

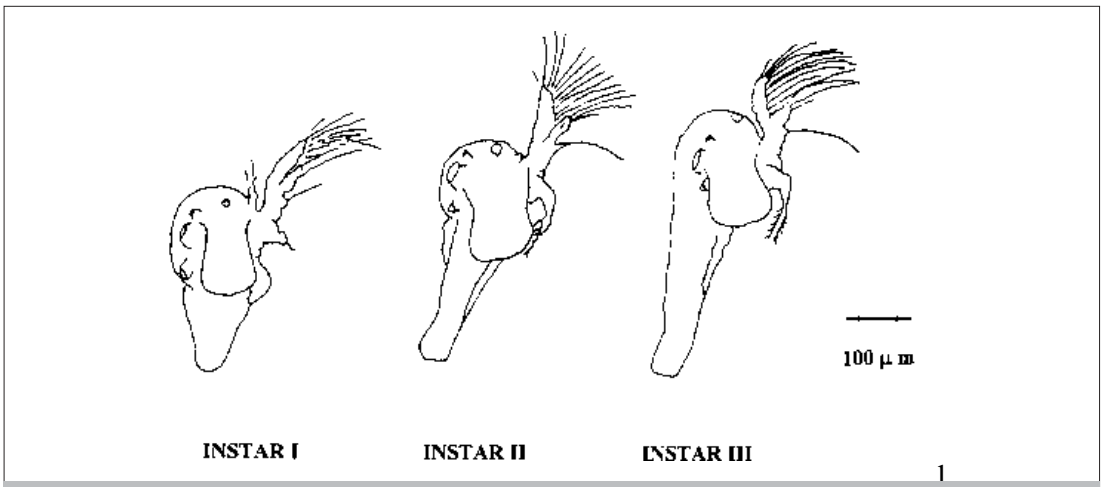


Figura 1: Caratteristiche morfologiche di naupli di Artemia sp.

zione bisessuale e a 84 nella maggior parte delle forme partenogenetiche. Le uova, o cisti, prodotte dalle femmine partenogenetiche, utilizzate nel presente metodo, danno origine soltanto a individui femmine. La produzione di maschi da femmine partenogeniche è molto rara e non è ancora del tutto spiegabile.
Le cisti prodotte dalle femmine partenogeniche possono essere conservate a secco per perio-

di molto lunghi di tempo. Immergendo le cisti in acqua di mare in condizioni di illuminazione e, ad un adatta temperatura, si sviluppano entro le successive 24 ore larve allo stadio I liberamente natanti. Nel successivo stadio II e III si assiste ad uno sviluppo degli arti motori e dell'addome. Le larve possono a questo stadio essere utilizzate nei test di tossicità.

APPENDICE B - Metodo per la preparazione di cisti in laboratorio

I naupli di artemia possono essere allevati con la seguente procedura sino a raggiungere la maturità sessuale al fine di ottenere uova durature.
Utilizzando 250 mL della soluzione (6.2) alla concentrazione salina di 35 g/L si pongono in un beaker di vetro da 500 mL sino a 50 naupli. L'allevamento va effettuato a fotoperiodo e temperatura controllate (L:D 14:10 ore, 3000-4000 lux, 25±1°C) e sotto insufflazione d'aria a microbolle. I naupli devono essere nutriti con colture pure (10^{7-8} cellule/mL) di alghe verdi (es. *Dunaliella salina*, *Chlorella sp.*, *Chlamidomonas sp.) Phaeodactylum tricornutum* (*diatomea*) con aggiunte almeno ogni 48 ore (Chiaudani e Vighi, 1978). La quantità di alghe fornita all'allevamento va incrementata con l'aumentare delle dimensioni delle artemie sino a raggiungere le 10^{5-6} cellule per mL di soluzione d'allevamento. Il permanere della torbidità del mezzo acquoso può costituire un indice visivo in base al quale rinviare la somministrazione del cibo. La maturità sessuale si raggiunge a partire dal 16-20° giorno dall'inizio dell'allevamento; la quantità e la qualità del cibo condizionano la percentuale di individui che raggiungono la maturazione. Il rinnovo parziale e bisettimanale dell'acqua nei beaker costituisce una condizione necessaria per una corretta conduzione dell'allevamento. È consigliabile mantenere contemporaneamente almeno tre contenitori di allevamento, in modo che un qualsiasi inconveniente non comporti la perdita dell'organismo. Le cisti prodotte vengono raccolte con una pipetta (in materiale plastico inerte o in vetro), si lasciano asciugare alla temperatura di 25±1°C, si pesano e si conservano in contenitori a tubetto da 2 mL di plastica alla temperatura di 4±1°C. Si consiglia di utilizzare le cisti entro sei mesi dalla data di produzione.

8070. Metodo di valutazione della tossicità acuta con *Cyprinodon variegatus*

1. Introduzione

Viene indicata nel seguito la procedura per valutare in acque di mare o in effluenti sversati in acque marine, la presenza di inquinanti a concentrazioni tali da causare effetti tossici acuti per il pesce *Cyprinodon variegatus*. L'assenza di effetti tossici acuti per un dato campione non esclude che essi siano osservabili in campioni prelevati in momenti diversi, semplicemente a causa della variabilità dello scarico o della capacità di diluizione dell'area in cui lo scarico è sversato. Si tenga presente inoltre, che la mancata osservazione della tossicità di tipo acuto non esclude la presenza di effetti cronici.

2. Generalità sul metodo

Il saggio ha una durata massima di 96 ore e permette di valutare la tossicità acuta di acque di scarico e acque marine sugli avannotti del ciprinodontide *Cyprinodon variegatus*. Un campione di acqua di scarico viene comunemente saggiato per la sua tossicità a 5 diverse diluizioni con soggetti coetanei aventi età compresa tra 1 e 14 giorni. L'elaborazione del numero di individui deceduti alle diverse diluizioni nell'arco del periodo di esposizione, permette di stimare la diluizione letale per il 50% degli avannotti (LC_{50}) relativamente al tempo di trattamento (48-96 h). Lo stesso schema sperimentale può essere adottato per la valutazione della tossicità acuta delle acque di mare recettrici. Raramente tuttavia, esse contengono concentrazioni di contaminanti tali da permettere di individuare la relazione dose-risposta. Più spesso il risultato si limita alla percentuale di organismi eventualmente deceduti in un campione non diluito e all'esame della significatività di tale dato. Si fa notare che la modesta differenza, pari a 3 giorni, esistente tra il presente metodo (96 h) ed il corrispondente saggio cronico (7 giorni) con lo stesso organismo, fa sì che il secondo sia il più possibile da preferire, permettendo di ottenere entrambi i risultati, quello relativo alla tossicità acuta e a quella cronica, con un incremento limitato di lavoro sperimentale. Qualora si ricerchino contemporaneamente informazioni acute e croniche dallo stesso campione, la procedura deve attenersi alle indicazioni del saggio cronico (7 giorni) al quale, pertanto, si rinvia.

3. Conduzione del saggio

3.1 Materiali e strumentazione

La conduzione del test di tossicità richiede:

- almeno 12 contenitori (bicchieri) in vetro borosilicato con volume utile di 200 mL;
- sistema di lampade fluorescenti ad ampio spettro, controllato da un temporizzatore per la simulazione del fotoperiodo e possibilmente da un dispositivo di transizione tra le fasi di luce e di buio;
- dispositivo per il mantenimento della temperatura delle soluzioni da saggiare a 20±1°C (o 25±1°C) e per l'intera durata del saggio;
- analizzatore di ossigeno disciolto;
- misuratore di salinità;
- fonte di aria compressa a bassa pressione con diffusori a pietra porosa o can-

nule in vetro. Negli impianti centralizzati alimentati da un compressore, gli oli sono contaminanti comuni. Essi vanno rimossi con cartucce a carbone attivo;
- 2-4 imbuti separatori da 2 L;
- miscela di sali per la preparazione di acqua di mare sintetica. Le miscele commerciali Forty Fathoms® e HW Marinemix® hanno dato buoni risultati sia per la coltura che per la conduzione dei saggi;
- cisti di Artemia salina con le caratteristiche indicate in APPENDICE A5.

3.2 Organismi per il saggio

Il saggio acuto viene allestito con gli stadi giovanili di *C. variegatus*. Sono utilizzabili individui di età compresa tra 1 e 14 giorni, che devono essere coetanei, e cioè di età che non differisce per più di 24 ore. Gli avannotti possono essere acquistati da allevatori specializzati od ottenuti in laboratorio da esemplari adulti mantenuti secondo la procedura descritta in Appendice.

3.3 Acqua di diluizione

In relazione alle finalità stabilite per il saggio, è possibile scegliere il tipo di acqua di diluizione più adeguato.

a) Se l'obiettivo è di stimare la tossicità acuta di un effluente producendo un dato assoluto ovvero svincolato dalle caratteristiche delle acque recettrici, verrà utilizzata un'acqua di diluizione sintetica standard. In Tab. 1 vengono elencati i sali con i rispettivi dosaggi necessari per la preparazione di acqua di mare sintetica con salinità pari a circa 31‰. Salinità maggiori o minori sono ottenute con quantità della miscela salina adeguate in proporzione. Per la preparazione dell'acqua di mare si usa una base di acqua Milli-Q o deionizzata di qualità equivalente alla quale vengono aggiunti i nove sali elencati in Tab. 1, singolarmente, secondo la sequenza indicata e assicurandosi che ciascuno si sia sciolto prima dell'aggiunta del successivo.

Tabella 1: Elenco dei sali di grado analitico e quantitativi necessari alla preparazione di acqua di mare artificiale di salinità 31‰

COMPOSTO	CONCENTRAZIONE (g/L)	QUANTITA' RICHIESTA per 20 L (g)
1 NaCl	21,030	420,60
2 Na_2SO_4	3,520	70,40
3 KCl	0,610	12,20
4 KBr	0,088	1,76
5 $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	0,034	0,68
6 $MgCl_2 \cdot 6H_2O$	9,500	190,00
7 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1,320	26,40
8 $SrCl_2 \cdot 6H_2O$	0,020	0,40
9 $NaHCO_2$	0,170	3,40

Per lo stesso scopo sono altrimenti utilizzabili le miscele di sali già pronte e disponibili in commercio, quali Forty Fathoms® e HW Marinemix® o anche altre marche purchè soddisfino i criteri di validità del saggio. Si fa notare, che l'accrescimento, l'attività riproduttiva e altre manifestazioni vitali fortemente dipendenti dalla qualità dell'acqua, sono difficilmente soddisfatte da una miscela semplificata come quella riportata in Tab. 1 e, pertanto, se l'acqua sintetica deve essere impiegata anche in saggi cronici o per la coltura degli organismi, si consiglia solo l'uso di miscele complete. Il valore di salinità previsto per un saggio in condizioni standard è pari a 35‰.

b) Nel caso la finalità del saggio sia quella di stimare la tossicità acuta di uno scarico nelle

acque recettrici non contaminate, sarà necessario usare come acqua di diluizione quella prelevata nell'area di sversamento ma al di fuori dell'influenza delle eventuali fonti di contaminazione. L'acqua di diluizione dovrebbe essere prelevata immediatamente prima del saggio e non oltre le 96 ore dallo stesso. Se non usata entro le 24 ore dal prelievo, l'acqua di diluizione verrà refrigerata (4°C). Se l'area recettrice è contaminata o sospettata di esserlo, si può ricorrere ad acque naturali o semisintetiche aventi caratteristiche fisiche e chimiche il più possibile simili a quelle dell'acqua recettrice.

c) Se infine, l'obiettivo del saggio è di esaminare le interazioni, siano esse additive o antagoniste, tra i contaminanti dello scarico e quelli già presenti nell'acqua recettrice, quest'ultima sarà utilizzata come acqua di diluizione, indipendentemente dal suo grado di contaminazione, purchè prelevata al di fuori dell'area influenzata dallo scarico in esame. Nell'allestimento di questo tipo di saggio è necessario includere un secondo gruppo di controllo in cui gli organismi vengono esposti solo ad acqua di allevamento.

Generalmente un effluente ha una salinità trascurabile. Gli organismi devono tuttavia essere esposti alle diverse diluizioni di uno scarico senza che le differenti salinità delle soluzioni possano rappresentare una fonte di stress aggiuntivo a quello dei tossici o più semplicemente una fonte di variabilità dei risultati. Si tratta pertanto di uniformare la salinità delle diverse diluizioni di acqua di scarico. A questo scopo, si dispone di due soluzioni: la prima prevede l'impiego di acqua di mare ipersalina (100‰) come acqua di diluizione, mentre la seconda consiste nell'aggiungere i sali commercializzati per la preparazione di acqua di mare artificiale. Il principale vantaggio della prima soluzione è che l'acqua ipersalina può essere ottenuta, per evaporazione, da acqua di mare naturale di elevata qualità. Come tale essa contiene tutti i micronutrienti e colloidi biogenici richiesti per l'accrescimento e l'attività riproduttiva degli organismi marini, e può essere conservata per periodi prolungati senza apparente degradazione. Il limite della prima soluzione risiede nel fatto che un effluente può essere saggiato ad una concentrazione massima non superiore all'80% se la salinità prescelta è del 20‰, od anche del 70% se la salinità voluta è del 30‰. La seconda soluzione non presenta questo limite ma l'aggiunta di sali può, dal canto suo, modificare il pH dell'effluente o dell'eventuale acqua che richiede aggiustamenti, potendo modificare in tal modo anche la tossicità del campione. In generale, si tenga presente che valori di pH al di fuori dell'intervallo 6,0-9,0 possono contribuire alla mortalità degli organismi. Se necessario il pH può essere riportato al valore desiderato con aggiunte di HCl o NaOH. Dopo l'aggiunta dei sali la soluzione viene mantenuta in agitazione moderata per circa 60 minuti con l'aiuto di un agitatore magnetico, e ciò per garantire che tutti i sali siano entrati in soluzione prima di introdurre gli organismi. È consigliabile includere nella serie dei trattamenti anche un controllo con acqua preparata in modo analogo per aggiunta di sali, al fine di verificare che tale procedura non causi effetti negativi.

3.4 Illuminazione

Nel corso della prova gli organismi sono esposti alle soluzioni da saggiare mantenendo le stesse condizioni di illuminazione applicate nell'area di allevamento. Le lampade fluorescenti ad ampio spettro, le stesse impiegate per illuminare gli allevamenti degli organismi nel laboratorio, devono fornire, nell'area di sperimentazione, un'intensità luminosa di circa 500-1000 lux con un fotoperiodo pari a 16 ore di luce e 8 ore di buio. Questa intensità luminosa è quella comunemente riscontrabile nell'ambiente di laboratorio.

3.5 Temperatura

Le soluzioni da saggiare sono mantenute per tutta la durata del saggio a 20±1°C mediante immersione dei contenitori in bagni termostatati o con il condizionamento dell'intero ambiente dedicato alla sperimentazione. Se il risultato tossicologico dovrà essere utilizzato per studiare la relazione tra effetti acuti e cronici di una data sorgente di contaminazione, il saggio acuto deve essere condotto alla temperatura di 25±1°C, e cioè la stessa del saggio a 7 giorni.

3.6 Alimentazione

Le giovani larve di *C. variegatus* sono nutrite con naupli di artemia fino all'avvio del saggio. Se il saggio ha una durata di 48 ore, gli organismi sono mantenuti a digiuno. Se il saggio è protratto alle 96 ore, l'alimentazione è sospesa per la prima metà della prova ma si provvede alla somministrazione di 0,2 mL di sospensione concentrata di naupli di artemia circa 2 ore prima del rinnovo delle soluzioni, operazione che viene generalmente condotta allo scadere delle 48 ore. Le artemie vengono concentrate con l'aiuto di un retino di nylon lasciando quel poco d'acqua necessario a permettere il loro trasferimento (vedi Appendice A5).

3.7 Ossigeno disciolto

Poichè esiste la possibilità di una riduzione della concentrazione di ossigeno disciolto, soprattutto alle concentrazioni di effluente più elevate, si rende necessario controllare questo parametro, e con maggiore frequenza durante le prime ore del saggio. La concentrazione di ossigeno disciolto non deve essere mai inferiore al 40% del valore di saturazione. In caso contrario si deve provvedere all'aerazione delle soluzioni facendo gorgogliare aria compressa priva di contaminanti mediante cannule in vetro, pipette Pasteur od anche diffusori del tipo a pietra porosa. Il flusso d'aria deve essere regolato al minimo livello possibile, in modo tale da soddisfare il criterio di validità del saggio senza arrecare disturbo agli organismi. Indicativamente si può suggerire un flusso pari a 100 bolle/minuto. Se l'aerazione si rende necessaria per una diluizione, anche le altre dovranno essere parimenti aerate.

4. Procedura di saggio con diluizione (effluente)

4.1 Saggio preliminare

Generalmente non è necessario condurre una prova preliminare con acque di scarico o del recettore tuttavia, qualora ci si appresti a saggiare un campione d'acqua di qualità completamente sconosciuta, può essere utile ottenere alcune informazioni preliminari per meglio individuare l'intervallo di tossicità nel cui ambito sarà poi condotto il saggio definitivo. A questo scopo si allestisce una prova semplificata e di durata ridotta rispetto a quella definitiva. Si preparano 5 diluizioni del campione, in serie geometrica ed ampiamente spaziate tra loro; la sequenza 100%, 10%, 1%, 0,1% e 0,01% (v/v) può essere suggerita per tale scopo. Ad ogni diluizione vengono esposti 5 avannotti e dopo una durata massima di 24 ore si registrano i risultati. Se lo stesso campione in esame dovrà poi essere saggiato nella prova definitiva si raccomanda di procedere nel rispetto dei limiti di conservabilità del campione stesso. Se viceversa le due prove sono condotte con campioni prelevati in momenti diversi si tenga presente che, a causa della variabilità più o meno elevata della tossicità dello scarico o del recettore, i risultati del saggio preliminare e di quello definitivo possono essere tra loro anche molto differenti.

4.2 Saggio definitivo

Per la conduzione della prova definitiva si allestiscono 5 diluizioni del campione da esaminare. La sequenza 100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25% (v/v), caratterizzata da un fattore di diluizione pari a 0,5, è applicabile a gran parte delle situazioni. Viceversa, basandosi anche sulle informazioni eventualmente ottenute dal saggio preliminare, si potrà adottare un diverso intervallo di sperimentazione, un diverso fattore di diluizione o anche un maggior numero di concentrazioni. Se è stato necessario refrigerare i campioni di scarico o di acqua di diluizione, i volumi necessari alla conduzione del saggio vengono prelevati dai contenitori, previo accurato mescolamento, e portati alla temperatura di 20±1°C. Preparate le diluizioni previste con le eventuali correzioni di salinità, si misura la concentrazione di ossigeno disciolto e se questa risultasse prossima al limite del 40% del valore di saturazione si procede ad aerare i contenitori (vedi Paragrafo 3.7). Quando le soluzioni hanno raggiunto le condizioni indicate si introducono gli avannotti.

In un test di tossicità acuta i risultati ottenuti dalle diverse repliche vengono solitamente combinati ai fini del calcolo della LC_{50}; ciò rende inutile, da un lato, la pratica di suddividere il gruppo di organismi in più contenitori. Per ogni diluizione di effluente e per il controllo si utilizzano almeno 10 avannotti di *C. variegatus* in soluzioni di volume minimo pari a 200 mL. Gli organismi vengono distribuiti secondo una sequenza casuale nei diversi contenitori sino al completamento del numero richiesto. Per evitare diluizioni significative delle soluzioni del saggio, è opportuno minimizzare il volume d'acqua trasferito con gli organismi.
Allo scadere delle 48 h di esposizione si procede al rinnovo delle soluzioni ed al trasferimento in queste ultime degli avannotti che già sono stati esposti per 48 ore alle diluizioni di effluente corrispondenti. Se si sospetta che lo scarico contenga tossici facilmente ossidabili o degradabili o che l'eventuale aerazione aumenti la velocità di tali processi, si rende opportuno rinnovare giornalmente le soluzioni del saggio. In questo caso la procedura da seguire è analoga a quella descritta per l'allestimento della prova.
È necessario evitare che l'eccessiva evaporazione delle soluzioni di saggio ne alteri la salinità e la concentrazione degli inquinanti. Il fenomeno può essere controllato con fogli di polietilene trasparenti, vetri di orologio o altro dispositivo atto a coprire i recipienti di saggio.
Giornalmente si osservano gli organismi e si registra il numero di avannotti deceduti, rimuovendoli al più presto dai contenitori del saggio. Sono considerati deceduti quei pesci che sono privi di movimenti opercolari o che non reagiscono ad un leggera stimolazione. È utile disporre delle osservazioni a 24, 48, 72 e 96 ore di esposizione, e può essere anche utile registrare ogni altra alterazione che sia osservabile negli avannotti trattati rispetto a quelli di controllo.
Il saggio di tossicità acuta termina allo scadere delle 96 ore dal suo avvio.
Gli esemplari di *C. variegatus* sopravvissuti alle prove tossicologiche non possono essere riutilizzati. Inoltre, non appartenendo a specie indigene, non devono assolutamente essere liberati o dispersi nell'ambiente.

5. Procedura di saggio senza diluizione (corpo idrico)

5.1 Saggio definitivo

Per determinare se le acque del recettore contengono tossici in concentrazioni tali da causare effetti acuti, si espongono gli avannotti di *C. variegatus* a un campione non diluito delle acque del recettore stesso.
Se necessario, 24 ore prima della schiusa, le uova di *C. variegatus* vengono acclimatate ad un'acqua, sia essa naturale che semisintetica, avente caratteristiche simili a quella da saggiare, almeno per quanto riguarda la salinità (vedi Appendice). L'acqua di acclimatazione viene anche usata per l'allestimento del controllo.
A differenza del saggio con effluenti, il campione dell'area recettrice viene saggiato in quattro repliche ed altrettante ne vengono allestite per l'acqua di controllo. In ciascuna replica, avente volume di 200 mL, vengono trasferiti 10 avannotti. In questo saggio i risultati delle repliche non vengono cumulati ed al contrario, essi servono a determinare se la mortalità osservata nel campione è significativamente diversa da quella eventualmente osservata nel controllo. Le restanti condizioni sperimentali sono da considerare invariate (cfr. par. 4).
Se il campione non diluito dell'acqua del corpo recettore causa una mortalità superiore al 50% degli organismi esposti, si può procedere alla stima del grado di tossicità delle sue acque e cioè all'esame della relazione concentrazione-risposta. In questo caso si procede come è stato descritto per il saggio con diluizione (vedi Capitolo 4).

6. Validità del saggio

I risultati dei saggi sono considerati accettabili se la sopravvivenza degli organismi di controllo è ≥90% e se la concentrazione di ossigeno disciolto si è mantenuta ≥ 40% del valore di saturazione nei diversi trattamenti.

Pur senza porre ulteriori vincoli alla validità dei risultati, periodicamente si consiglia la conduzione di saggi in condizioni standard con un tossico di riferimento, quale ad esempio il bicromato di potassio o il pentaclorofenolo. Questa pratica dovrebbe consentire di evidenziare condizioni sperimentali o lotti di organismi, per qualche motivo, anomali. In condizioni normali, disponendo di una congrua serie di LC_{50}, il risultato di ogni nuovo saggio di riferimento dovrebbe collocarsi entro l'intervallo definito dal valore medio di tale serie e dal doppio del corrispondente scarto tipo (media ±2·scarto tipo). Viceversa, se la LC_{50} del tossico di riferimento si colloca all'esterno di questo intervallo di sicurezza, tutti i dati ottenuti con il medesimo lotto di organismi dovrebbero essere considerati con cautela.
Con valore solamente indicativo, vengono riportati i risultati di alcune prove d intercalibrazione cui parteciparono da 4 a 6 laboratori utilizzando due sostanze tossiche, l'argento nitrato e l'endosulfan (US EPA, 1985). I saggi vennero condotti sia in condizioni statiche che in flusso continuo ed i rispettivi coefficienti di variazione furono 35% e 50%, per l'argento nitrato, e 37% e 46% per l'insetticida. Una serie di 5 saggi condotti da un medesimo laboratorio con cromo esavalente, diede 23,2 mg Cr^{+6}/L come valore medio della $96hLC_{50}$ e un coefficiente di variazione pari a 25%. Una serie analoga di quattro saggi, condotti da un diverso laboratorio diede per gli stessi parametri i valori di 21,4 mg Cr^{+6}/L e 25,1%. La $96hLC_{50}$ del pentaclorofenolo ottenuta mediante un saggio in flusso continuo è risultata di 442 µg/L. Tutti questi dati, prodotti da autori diversi, sono tratti da McCulloch e Rue (1989).

7. Analisi dei risultati

7.1 Calcolo della LC_{50}

Il saggio per la valutazione della tossicità acuta descritto in questa procedura si propone non solo l'identificazione delle sorgenti di contaminazione capaci di effetti tossici acuti ma anche la quantificazione della loro potenziale tossicità mediante la stima della concentrazione letale al 50% degli organismi (LC_{50}) per un dato tempo di esposizione (24-48 h). La determinazione della LC_{50} può essere effettuata con diversi metodi la cui applicabilità è in buona parte dipendente dal tipo di risultati ottenuti, e più precisamente dal numero di effetti parziali osservati, intermedi cioè tra la mortalità 100% e la mortalità nulla. La valutazione della LC_{50} dovrebbe basarsi sui risultati relativi ad almeno 5 concentrazioni di campione ed un controllo, sebbene molti metodi di analisi possono essere utilizzati con un numero di dati inferiore. Se la massima concentrazione saggiata ha causato una mortalità inferiore al 50%, non si dovrebbe procedere al calcolo della LC_{50}, il cui valore sarebbe in tal caso poco attendibile. Meglio ripetere il saggio, se possibile, cercando di migliorare la serie delle concentrazioni saggiate. In caso contrario la LC_{50} sarà più correttamente espressa come "maggiore della massima concentrazione sperimentata" (es. $48hLC_{50}$>80%).
Nel metodo 8020, dedicato alla valutazione della tossicità acuta con *Daphnia magna*, sono stati proposti tre diversi metodi, ampiamente validati, atti alla valutazione della LC_{50}. Si tratta del metodo di Litchfield e Wilcoxon, del "test" binomiale e del metodo "probit". Essi sono adeguatamente illustrati nell'ambito della Sezione 8020 al quale si rinvia. Infine, è opportuno segnalare che sono disponibili in commercio alcuni programmi per personal computer espressamente dedicati a diversi metodi di analisi statistica di risultati tossicologici, a questi prodotti parimenti si rinvia.

7.2 Effetti da concentrazione unica

L'esame dei risultati ottenuti saggiando un campione non diluito del corpo idrico è riconducibile alla teoria del confronto tra due campioni. Nel presente schema sperimentale, i decessi osservati nelle repliche del corpo idrico e in quelle del controllo rappresentano i due campioni di dati posti a confronto.
Di fatto, se la mortalità degli organismi esposti al corpo idrico supera il valore del 10%, e cioè quel limite di decessi accettato come "naturale" in un gruppo di individui di controllo, si può già concludere che il campione contiene inquinanti a concentrazioni tossiche. Tuttavia può es-

sere opportuno dare supporto statistico al risultato del saggio, verificando la cosiddetta ipotesi nulla o zero, e cioè che le medie dei decessi osservati nei due trattamenti siano uguali. Smentire l'ipotesi con un certo grado di probabilità, solitamente P=0,05, equivale a verificare che la mortalità osservata per gli organismi esposti al corpo idrico è significativa.
Il test "*t*" è utilizzato per confrontare i due campioni e, dal momento che vi è un'attesa di contaminazione o di mortalità maggiore per il campione del corpo idrico piuttosto che per il controllo, un test unilaterale è generalmente adeguato. L'applicazione del test "*t*" richiede che le proporzioni di decessi osservati nelle repliche siano distribuite normalmente. Se i dati soddisfano questo requisito è necessario procedere anche alla verifica di omogeneità della varianza dei due gruppi di risultati e solo in caso affermativo è lecito passare all'esame della significatività dei decessi osservati. Se i dati non fossero distribuiti normalmente il problema viene comunemente risolto mediante opportune trasformazioni dei dati stessi. La conversione delle proporzioni di organismi deceduti nella radice quadra del loro arc sen è la trasformazione più comune. Se non si rivelasse risolutiva è necessario procedere all'esame dei risultati con metodi non parametrici. Se, a sua volta, la condizione di omogeneità della varianza non fosse rispettata, il test "*t*" rimane valido ma deve essere applicato in forma modificata. Il valore calcolato per la funzione "*t*" è infine confrontato con il valore critico di "*t*" individuabile in apposite tabelle, in base al numero di gradi di libertà ed al livello di probabilità prescelto. Se il valore di "*t*" calcolato supera il valore tabellare, le due mortalità sono significativamente diverse. Sono disponibili in commercio dei programmi per personal computer che sono espressamente dedicati all'analisi statistica dei risultati tossicologici e possono svolgere tutte le operazioni necessarie. A questi prodotti, pertanto, si rinvia.

APPENDICE

A1 - Note sulla biologia di *Cyprinodon variegatus*

La famiglia dei Cyprinodontidae include 45 generi e 300 specie distribuite in tutti i continenti ad eccezione dell'Australia. La maggior parte delle specie sono d'acqua dolce mentre alcune popolano le acque salmastre e quelle marine costiere. Negli Stati Uniti sono presenti 13 specie del genere *Cyprinodon*, delle quali *C. variegatus* è l'unica specie marina ampiamente distribuita nelle acque costiere dell'Oceano Atlantico e del Golfo del Messico. In Italia il genere è rappresentato da una specie e cioè *C. fasciatus* noto anche coi sinonimi di *C. calaritanus* o di *Aphanius fasciatus* (Cottiglia, 1980).
Gli esemplari adulti di *C. variegatus* possono raggiungere una lunghezza totale di 93 mm, ma la lunghezza media comunemente riportata è di 35-50 mm. I maschi sono un poco più lunghi degli individui di sesso femminile ed in generale il dimorfismo è piuttosto evidente. Il corpo dei maschi è tozzo, compresso e con un certo sviluppo verticale che aumenta con l'età dell'individuo. A tale forma, il profilo superiore contribuisce maggiormente essendo più arcuato dell'inferiore. Il colore della regione dorsale è olivastro con un'area verde-bluastra. Sui fianchi è presente una serie di strisce scure scarsamente definite mentre la colorazione del ventre varia dal bianco-giallastro all'arancio.
La femmina ha colorazione più chiara con varianti dall'olivastro, al bruno o all'arancio. I fianchi presentano 14 strisce scure che si alternano con 7-8 bande, parimenti scure, poste dorsalmente. Il ventre e l'area ventrale dei fianchi sono di colorazione bianco-giallastra. La pinna dorsale, all'altezza dei raggi posteriori, ha uno o due ocelli che negli individui maschili sono mancanti o trasformati in una chiazza scura poco definita.
C. variegatus è una specie eurialina che popola una varietà di habitat caratterizzati da acqua poco profonda, quali piccole baie, stagni salmastri, pozze di marea, potendo diventare tuttavia molto abbondante anche in aree litorali prive di vegetazione emergente, con fondali parzialmente sabbiosi e con modeste correnti o moto ondoso. È stato anche osservato in laghi interni con elevate concentrazioni saline. La possibilità di occupare questi ambienti è chiaramente legata alla sua tolleranza per valori estremi sia di temperatura che di salinità (Nordlie, 1987) ed è stato osservato sia in acque a salinità pressochè nulla che a salinità del 59‰ e anche superiori.

Questo pesce onnivoro è un importante componente degli ecosistemi estuariali fungendo da legame tra i livelli trofici più bassi, detrito e organismi bentonici, ed i carnivori dei livelli trofici superiori. Esso è spesso preda di specie ittiche aventi importanza commerciale o ricreativa.
C. variegatus si riproduce in acque di modesta profondità (2,5-60 cm) di lagune a mangrovie, pozze di marea e stagni costieri aventi fondali di sabbia, limo scuro o fango. I maschi occupano territori aventi un diametro di 30-60 cm all'interno dei quali costruiscono talvolta dei nidi. L'accoppiamento può essere indotto oltre che dalla temperatura dell'acqua anche da bruschi cambiamenti della salinità (Martin, 1972). Le uova sono pressochè bentoniche e grazie alla presenza di sottili filamenti distribuiti più o meno uniformemente sul corion, esse sono anche adesive. Calando verso il fondo si legano ad una varietà di substrati quali piante, sabbia, roccia od altro, potendo anche essere parzialmente coperti dal sedimento. Il tuorlo contiene un globulo oleoso molto grande e parecchi altri più piccoli. In relazione agli eventi climatici che caratterizzano una determinata area geografica, l'attività riproduttiva può essere pressochè continua per tutto l'arco dell'anno (Hansen e Parrish, 1977) o limitata alle stagioni favorevoli, che poi sono generalmente quella primaverile e quella estiva.

A2 - Mantenimento degli organismi

Gli esemplari di *C. variegatus* necessari a costituire il gruppo dei riproduttori possono essere ottenuti o da allevatori specializzati o da laboratori di ricerca. In quest'ultimo caso essi possono derivare a loro volta da organismi nati in laboratorio. La periodica acquisizione di gruppi selvatici o l'impiego di organismi di prima generazione è una pratica da adottare allo scopo di minimizzare l'incrocio tra consanguinei. Qualora sia possibile ottenere gruppi di organismi selvatici, è opportuno che essi vengano mantenuti in osservazione per almeno una settimana al fine di poter individuare manifestazioni patologiche o mortalità elevate derivanti dallo stress della cattura e del trasporto. Gli individui danneggiati od ammalati devono essere scartati.
C. variegatus può essere allevato in condizioni semistatiche o con sistemi a flusso continuo. Questi ultimi richiedono grandi volumi d'acqua di buona qualità, il che può rappresentare un problema per talune strutture.
In laboratorio, *C. variegatus* può essere allevato dallo stadio di uovo sino a quello di adulto sessualmente maturo. I diversi stadi del ciclo vitale devono essere ospitati in vasche di dimensioni appropriate e mantenuti a temperatura ambiente, purchè compresa tra 18 e 20°C. In caso contrario è necessario adottare dei sistemi di termostatazione.
Gli adulti possono essere mantenuti sia in acqua di mare naturale che artificiale ed in vasche del tipo "tutto vetro". Se non è possibile il mantenimento in flusso continuo, le vasche devono essere dotate di un sistema di filtrazione biologica, capace cioè di rimuovere i cataboliti che altrimenti si accumulerebbero, potendo causare la morte dei pesci.
In condizioni semistatiche la densità di organismi che può essere mantenuta nelle vasche è molto legata alla capacità di depurazione del sistema di filtraggio biologico di cui esse devono essere dotate. È comunque consigliato un volume di circa 20 L per ogni individuo adulto, volume riducibile se i risultati analitici di ammoniaca e nitriti dimostrano che il sistema è capace di trattare carichi di biomassa maggiori. Per gli avannotti è accettabile una densità di mantenimento di circa 300 larve in una vasca da 80 L.
Il sistema di filtraggio biologico, è costituito comunemente da due parti: una posizionata sul fondo delle vasche e detta pertanto "sotto sabbia", l'altra, esterna alla vasca stessa. L'acqua viene fatta fluire, mediante delle pompe di buona portata, attraverso l'unità esterna che è riempita con vari tipi di materiali inerti i quali, oltre all'azione filtrante di tipo meccanico, svolgono anche quella di supporto per la crescita dei microorganismi che operano la depurazione biologica. Il sistema di filtraggio biologico deve essere condizionato, come indicato nel seguito, prima che la vasca sia in grado di accogliere il numero di organismi desiderato. L'unità filtrante può considerarsi a regime quando si sono sviluppati batteri nitrificanti (*Nitrosomonas* e *Nitrobacter*) in grado di convertire ammoniaca e nitriti, prodotti dai pesci e dai residui di mangime, a nitrati.
Partendo da una vasca appena allestita, i modi più semplici di attivare il condizionamento del sistema di filtrazione consistono nell'introduzione di piccole quantità di mangime per pesci o

di scarti sifonati da una vasca già in funzione o, meglio ancora, di parte dei "fanghi" del suo sistema di filtrazione. Il materiale in decomposizione causerà un aumento della concentrazione di ammoniaca al quale seguirà, dopo diversi giorni, anche un aumento dei nitriti, preceduto solitamente dalla diminuzione dell'ammoniaca stessa. La caduta al disotto dei limiti di rilevabilità delle due specie chimiche indica che il condizionamento del sistema filtrante è pressochè completato. Si tratta ora di aggiungere gradualmente i pesci continuando il controllo analitico della funzionalità del sistema biologico.

A3 - Riproduzione in laboratorio

Gli embrioni di *C. variegatus* possono essere reperiti presso fonti esterne od ottenuti in laboratorio da individui adulti. A loro volta, le uova mature sono ottenibili o per deposizione naturale o iniettando le femmine intraperitonealmente con l'ormone gonadotropina corionica di origine umana. Nel seguito verrà esaminata solo la soluzione naturale che è generalmente da preferire. In questo caso più deposizioni possono essere ottenute dagli stessi individui mentre, con l'iniezione ormonale, i pesci devono poi essere sacrificati per ottenere i gameti.
C. variegatus raggiunge la maturità sessuale dopo 3-5 mesi dalla schiusa. Se mantenuto in vasche di dimensioni adeguate e con buona alimentazione, la sua taglia è a questo stadio di circa 34 mm per il maschio e di circa 27 mm per la femmina. A questo punto il dimorfismo sessuale si rende evidente e gli individui di sesso maschile manifestano comportamento territoriale. La normale temperatura di mantenimento anche degli organismi sessualmente maturi deve aggirarsi sui 18-20°C, mentre per indurre l'attività riproduttiva i pesci adulti vengono trasferiti nelle vasche di deposizione, che sono mantenute alla temperatura di 25°C.
È importante che gli organismi in riproduzione siano mantenuti in un'area del laboratorio lontana da fonti di disturbo, impiegando a tale scopo anche dei pannelli con i quali circoscrivere la zona dedicata all'allevamento. Occorre, inoltre, fare attenzione che fonti luminose esterne non interferiscano con il fotoperiodo artificiale applicato in detta zona.
Il numero di individui dedicati alla riproduzione e di conseguenza il numero delle vasche, dipende dalla richiesta di avannotti per la sperimentazione tossicologica. Una femmina adulta produce mediamente 10-30 uova per deposizione, potendosi riprodurre varie volte a intervalli di 1-7 giorni. Per ottenere gli embrioni necessari ad un saggio, normalmente si trasferiscono 8-10 femmine e 3 maschi in una vasca di riproduzione avente volume di circa 60 L, temperatura di 25°C e con fotoperiodo pari a 16 ore di luce e 8 ore di buio. Il trasferimento viene effettuato 7-8 giorni prima dell'allestimento del saggio.
All'interno della vasca di riproduzione vengono alloggiate una camera di deposizione ed una sorta di vassoio per la raccolta degli embrioni. La camera è realizzata con rete di nylon® con maglia di 3-5 mm, od altro materiale atossico, atto alla realizzazione di un cesto avente dimensioni di circa 20 x 35 x 22 cm di altezza, che viene alloggiato all'interno della vasca. Per la realizzazione del vassoio di raccolta, si consiglia l'uso di griglie di materiale plastico con celle di dimensione 14 x 14 x 14 mm. Il vassoio è completato da una rete, con maglia di 250-500 µm, che viene incollata, con collante siliconico (per acquari), ad un lato (base) della griglia stessa. Tale accessorio semplifica la rimozione e la manipolazione delle uova.
Le uova fecondate cadono attraverso la rete di base della camera di deposizione e vanno ad aderire sulla superficie del vassoio di raccolta, che è posizionato in corrispondenza, sul fondo della vasca di riproduzione. Al mattino, si procede all'ispezione del vassoio di raccolta. Se il vassoio di raccolta non contiene sufficienti embrioni dopo le prime 24 ore, quei pochi vengono scartati, si riposiziona il supporto, e si raccolgono le uova prodotte nelle successive 24 ore. Per mantenere il più possibile pulita l'area di adesione degli embrioni, gli adulti vengono nutriti quando i supporti di raccolta sono rimossi.
I vassoi con le uova deposte entro le 24 ore, vengono raccolti dalle vasche di riproduzione e le uova sono delicatamente asportate con l'aiuto di una spruzzetta o di uno spazzolino morbido. Terminata la raccolta del numero di uova necessarie alla sperimentazione, gli individui adulti sono riportati alle vasche di mantenimento (18-20°C), facendo sempre molta attenzione alla gradualità dei cambiamenti di temperatura.
Se la frequenza di sperimentazione è elevata, è anche possibile garantire un rifornimento di uova pressochè quotidiano. A questo scopo si utilizza una vasca avente volume di circa 300 L, nel-

la quale vengono mantenuti degli individui adulti, approssimativamente 12-15 maschi con 50-60 femmine, alla temperatura di 23-25°C. Le uova fecondate vengono prodotte quotidianamente e quando necessario, è sufficiente posizionare i vassoi di raccolta sul fondo della vasca. Quattro vassoi, ciascuno con dimensioni di circa 20 x 45 cm, possono coprire l'intero fondo della vasca. Il mattino seguente si procede alla loro ispezione in accordo a quanto già descritto.
Indipendentemente dalla modalità riproduttiva prescelta, annualmente si procede alla sostituzione dei riproduttori con organismi provenienti da altri laboratori ma preferibilmente selvatici. Il rinnovo può essere effettuato anche con frequenza maggiore come nei casi in cui si osserva una diminuzione della fertilità degli organismi od ogni volta che l'elevata frequenza degli eventi riproduttivi o l'età avanzata dei riproduttori lo rendono consigliabile.

A4 - Incubazione degli embrioni

Generalmente le uova ottenute da diverse unità di deposizione vengono raccolte in un unico contenitore per garantire il numero di embrioni sufficiente all'allestimento di uno o più saggi. Le uova sono poi trasferite in una scatola Petri o in un cristallizzatore riempito con acqua di diluizione fresca e vengono esaminate con un microscopio binoculare al fine di scartare quelle non fecondate, che presentano muffe o altri danni. Gli embrioni vengono incubati in cristallizzatori, alla temperatura di 25°C e con un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio. In ogni cristallizzatore viene posizionato un diffusore a pietra porosa col quale si assicura un'aerazione continua e moderata per tutta la durata dell'incubazione. L'acqua dei cristallizzatori è rinnovata quotidianamente. Se la salinità dell'acqua di diluizione del saggio è diversa da quella delle vasche di incubazione, 24 ore prima della schiusa si provvede ad adeguare la salinità di queste ultime. L'adeguamento è tuttavia limitato a valori compresi tra il 20 e il 35‰ di salinità. Gli embrioni schiudono in 6-7 giorni a 25 °C, e in 4-5 giorni a 30°C.

A5 - Alimentazione

A5.1 - Generalità

Le colture di *C. variegatus* vengono alimentate giornalmente con quantità sufficienti di cibo di elevata qualità. Gli adulti e gli stadi giovanili sono nutriti con *A. salina* congelata e mangime per pesci in scaglie. Le larve vengono invece nutrite con naupli vivi appena schiusi di *A. salina* e mangime sbriciolato (per la schiusa di *A. salina* vedi Appendice A5.3). In generale, la quantità di cibo considerata ottimale è quella che viene prontamente consumata dai pesci. Per gli avannotti, tuttavia, soprattutto se il cibo è somministrato una volta al giorno, è preferibile dare una quantità di naupli di *Artemia* in leggero eccesso rispetto al consumo immediato, di modo che alcuni di essi restino sempre disponibili nelle vasche dei neonati.
È necessario evitare che nelle vasche si accumulino cibo non consumato, naupli deceduti, feci od altro residuo organico e particolarmente quando si operi in condizioni semistatiche. Almeno con frequenza settimanale, o più spesso se necessario, si provvede a rimuovere dal fondo delle vasche i residui con un sifone. Anche l'eccessiva crescita di alghe deve essere controllata periodicamente mediante rimozione, anche se non completa, poichè queste alghe costituiscono un'integrazione della dieta.

A5.2 - Idoneità della dieta

In particolari condizioni ambientali il crostaceo *Artemia salina* produce delle cisti quiescenti che permangono vitali per lunghi periodi di tempo, purchè conservate all'asciutto e in condizioni anaerobie (ASTM, 1992). Talvolta le cisti di *Artemia* sono indicate, impropriamente, come "uova"; in realtà si tratta di un embrione, allo stadio di gastrula, racchiuso da una cuticola che lo protegge dalla disidratazione. La resistenza di tale stadio quiescente fa sì che esso possa essere facilmente trasportato e commercializzato, e grazie alla sua praticità, venire ampiamente utilizzato in acquacoltura e in acquariologia per nutrire molti organismi acquatici. Reidratando le cisti in acqua di mare si riattiva lo sviluppo embrionale e dopo circa 24 ore, ne schiudono i naupli al primo stadio di sviluppo.

Le varietà geografiche e le corrispondenti fonti commerciali di cisti di *Artemia* sono numerose; tuttavia è stato osservato che il contenuto di contaminanti, le dimensioni del nauplio e la composizione in acidi grassi, differiscono ampiamente, influendo sulla idoneità del prodotto quale fonte di cibo (ASTM, 1992). Le cisti provenienti dal Brasile o dalla Columbia si sono dimostrate idonee sia per la modesta contaminazione che per le dimensioni adeguatamente ridotte delle giovani larve (US EPA, 1988). Anche altre aree di provenienza possono comunque rivelarsi adeguate, ma in ogni caso, l'unico modo di valutare l'accettabilità di una varietà di cisti è di condurre prove di alimentazione grazie alle quali si possono esaminare gli effetti su sopravvivenza e crescita di *C. variegatus*. Analogamente, anche se il fornitore rimane lo stesso, è necessario che ciascun nuovo lotto di cisti venga saggiato per verificarne l'idoneità. In entrambi i casi, si procede come segue: si conducono in parallelo due saggi cronici di 7 giorni, per ciascuno dei quali sono utilizzate almeno 3 repliche di 10-15 organismi ognuna. Il primo gruppo viene alimentato con i naupli di *Artemia* giudicati a suo tempo idonei e che hanno pertanto valore di riferimento, il secondo gruppo viene invece nutrito con i naupli schiusi dal lotto in esame. La frequenza di somministrazione del cibo, la sua quantità, il volume dei recipienti e dell'acqua di mare in essi contenuta e tutto quanto caratterizza il saggio non deve essere modificato rispetto alla procedura di saggio cronico (vedi Sezione 8110 per test di tossicità cronica (7 giorni) con *Cyprinodon variegatus*). La nuova fonte di cibo viene considerata idonea se non si osservano differenze statisticamente significative tra i due trattamenti relativamente a sopravvivenza e crescita.
Ogni nuovo lotto dovrebbe anche essere analizzato per il contenuto di pesticidi organoclorurati e PCB. Se questi superano complessivamente la concentrazione di 0,3 μg/g (peso fresco), le cisti di *Artemia* non dovrebbero essere utilizzate (US EPA, 1988). È quindi buona norma effettuare le necessarie analisi su un piccolo quantitativo di cisti, e nel caso si ottengano i risultati attesi, si può procedere all'acquisto di un lotto di notevoli dimensioni che potrà servire per diversi anni (ASTM, 1992).

A5.3 - Preparazione della dieta

Un imbuto separatore con un volume di 2 L costituisce un pratico contenitore per la schiusa delle cisti. Si utilizza 1 L di acqua di mare naturale o sintetica ma anche una soluzione contenente 35 g di NaCl si presta allo scopo. Si aggiungono 10 mL di cisti di *Artemia* e si area intensamente con un tubetto di vetro posizionato in modo che la sua estremità sia sul fondo dell'imbuto. Il tempo di schiusa, comunemente espresso come T_{90} (numero di ore necessario alla schiusa del 90% delle cisti), varia in relazione all'area geografica di provenienza e alla temperatura di incubazione. Tuttavia, con una temperatura di 27°C le uova dovrebbero schiudere in circa 24 ore. Dopo tale periodo si arresta l'aerazione e i gusci ormai vuoti si portano in superficie mentre i naupli si raccolgono sul fondo dal quale vengono prelevati mediante apertura del rubinetto dell'imbuto. Sfruttando la fototassia positiva delle larve, la raccolta può essere agevolata oscurando la parte superiore dell'imbuto. Tale operazione non deve protrarsi oltre i 5-10 minuti in quanto, l'elevata concentrazione di organismi raggiunta sul fondo del contenitore fa sì che, sospeso il gorgogliamento, l'ossigeno disciolto venga rapidamente esaurito provocando la morte dei naupli. L'apertura alterna del rubinetto dell'imbuto separatore consente di rimuovere a più riprese i naupli appena schiusi. Questi verrano filtrati e se necessario risciacquati o concentrati in mezzo fresco con l'aiuto di un contenitore col fondo di rete (maglie di 150 μm).
Il nauplio di artemia è incapace di nutrirsi di fonti di cibo esterne per un periodo di circa 24 ore dalla schiusa (25°C), durante le quali utilizza le riserve di tuorlo di cui è provvisto. In questo arco di tempo il valore nutrizionale e calorico del nauplio decadono progressivamente, e pertanto si consiglia di utilizzarlo subito dopo la schiusa o comunque entro le 2-6 ore dal T_{90} (ASTM, 1992). Grazie alla ripetibilità del tempo necessario alla schiusa delle numerose varietà di *Artemia* (T_{90} a temperatura costante), l'idratazione delle cisti può essere effettuata in base al momento giudicato più opportuno per la raccolta e la somministrazione dei naupli appena schiusi. A parità di altre caratteristiche tossicologiche e nutrizionali, la ridotta dimensione del nauplio deve costituire il criterio guida nella scelta della fonte commerciale di *A. salina*, e ciò per favorire l'attività predatoria degli avannotti di *Cyprinodon* (US EPA, 1988).

A6 - Acqua di mare artificiale

L'acqua di mare artificiale destinata al mantenimento in coltura di *C. variegatus* è preparata solubilizzando delle miscele di sali pronte all'uso e commercializzate a tale scopo. Nella versione originale del metodo US EPA per saggiare effetti cronici (7 giorni) con questo organismo è consigliata la miscela Forty Fathoms®, che ha fornito, in prove comparate, i migliori risultati (EPA, 1988). La miscela di sali viene disciolta in acqua deionizzata di buona qualità, Milli-Q o equivalenti, in quantità tali da ottenere salinità comprese tra 20 e 30‰. Le istruzioni fornite con le confezioni di sali marini devono essere seguite scrupolosamente ed i sali devono essere solubilizzati in contenitori dedicati a tale scopo e non nelle vasche di mantenimento dei pesci. Prima del suo impiego, l'acqua artificiale viene aerata moderatamente per 24 ore e lasciata in quiete per qualche giorno. L'aerazione porterà il pH, l'ossigeno disciolto ed altri gas in condizioni di equilibrio. Prima del suo impiego, la concentrazione di ossigeno nell'acqua artificiale deve risultare compresa tra il 90 e il 100% del valore di saturazione.
Con frequenza mensile si provvede al ricambio di almeno 1/4 dell'acqua di mantenimento o preferibilmente, di circa 1/10 ogni 15 giorni. L'acqua nelle vasche deve essere limpida. Se al contrario si presentasse opalescente o colorata, deve essere sostituita per almeno il 50%. L'acqua utilizzata per il rinnovo deve avere oltre al contenuto di ossigeno indicato, anche la stessa temperatura e salinità di quella di mantenimento. L'evaporazione nelle vasche e il conseguente aumento di salinità vengono compensati mediante aggiunta di acqua deionizzata o Milli-Q. Occorre provvedere inoltre all'aggiunta periodica di microelementi utilizzando delle soluzioni pronte all'uso e commercializzate per tale scopo. I dosaggi e la frequenza d'impiego sono indicati dal produttore.
Oltre al controllo delle concentrazioni di ammoniaca e nitriti, si consiglia di effettuare frequenti misurazioni di altri parametri aventi valore critico per il successo della coltura, quali: temperatura, pH, alcalinità, ossigeno disciolto ed anche nitrati. Nelle vasche di mantenimento e di coltura il tenore di ossigeno deve essere sempre maggiore del 60% della saturazione, ottenibile ricorrendo, se necessario, a diffusori a setto poroso. Il pH non deve scendere al di sotto di 7,5 e l'ambito di accettabilità è compreso tra 7,5 e 8,3. Nelle vasche a ciclo chiuso, in conseguenza a condizioni di elevato carico di organismi (sovraffollamento), alla somministrazione di cibo in eccesso e all'accumulo di rifiuti, è frequente osservare la diminuzione del valore di pH. In questi casi, rimossa la causa dell'acidificazione, il valore accettabile di pH può essere ristabilito mediante rinnovo di più del 50% dell'acqua della vasca con acqua di mare artificiale. Si raccomanda, infine, che i livelli di ammoniaca totale e di ione nitroso siano inferiori a 0,1 mg/L e che la concentrazione di ione nitrico non superi i 20 mg/L.

A7 - Organismi per il saggio

Per il saggio di tossicità acuta possono essere utilizzati individui di età compresa tra 1 e 14 giorni. Se si utilizzano gli avannotti entro 1-2 giorni dalla schiusa, è possibile mantenerli nei cristallizzatori in cui sono stati raccolti. Viceversa, superato questo limite, i giovani individui devono essere trasferiti in una vasca di mantenimento. Tutte le operazioni di trasferimento delle larve vengono effettuate con un tubetto di vetro avente diametro interno di 6-9 mm e lunghezza di 20-30 cm, provvisto di un bulbo elastico per l'aspirazione. L'uso dei retini solitamente impiegati per trasferire i pesci di maggiori dimensioni è in questo caso sconsigliato, potendo causare elevate mortalità degli avannotti.

BIBLIOGRAFIA

ASTM (1992): *"Standard practice for using brine shrimp nauplii as food for test animals in aquatic toxicology"*, American Society for Testing and Materials, ASTM E 1203-92.

COTTIGLIA M. (1980): "Pesci lagunari", *Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque lagunari e costiere italiane*, Vol. 1, C.N.R. AQ/1/90, pp 140.

HANSEN D.J. & PARRISH P.R. (1977): "Suitability of sheepshead minnows *(Cyprinodon variegatus*) for life-cycle toxicity tests", in*: Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*, ASTM STP 634. F.L. Mayer e J.L. Hamelink, eds. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, pp. 117-126.

MARTIN F.D. (1972): "Factors influencing local distribution of *Cyprinodon variegatus* (Pisces: Cyprinodontidae)", *Trans. Am. Fish. Soc.*, **101**, 89-93.

MCCULLOCH W.L. & RUE W.J. (1989): "Evaluation of a seven-day chronic toxicity estimation test using *Cyprinodon variegatus*", In *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment*: 12th vol. ASTM STP 1027, U.M. Cowgill and L.R. Williams, Eds., American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 355-364.

NORDLIE F.G. (1987). "Plasma osmotic Na^+ and Cl^- regulation under eurhyhaline conditions in *Cyprinodon variegatus* Lacepede", Comp. Biochem. Physiol. A, 86A, 57-61.

RICHARDS F.A. & CORWIN N. (1956): "Some oceanographic applications of recent determinations of the solubility of oxygen in seawater", *Limnol. Oceanogr.*, **1**, 263-267.

US EPA (1985): "*Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms*", W.H. Peltier C.I. Weber, U.S. Environmental Protection Agency, Report EPA/600/4-85/013, Cincinnati, OH.

US EPA (1988): "Sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) larval survival and growth test. Method 1004", in: *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms*, C.I. Weber, W.B. Horning, D.J. Klemm, T.W. Neiheisel, P.A. Lewis, E.L. Robinson, J. Menkedick e F. Kessler, eds. EMSL, US Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, EPA-600/4-87-028.

8080. Metodo di valutazione della tossicità acuta con trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*)

81. Introduzione

Viene indicata nel seguito la procedura standard per condurre dei saggi con trota su campioni di effluenti e su acque prelevate da corpi idrici recettori, allo scopo di individuare la presenza di sostanze tossiche in quantità tali da causare effetti tossici acuti. L'assenza di effetti acuti non preclude la possibilità di effetti cronici. Inoltre, a causa della variabilità temporale di uno scarico, un risultato negativo con un dato campione non esclude il riscontro di effetti tossici acuti in campioni prelevati in diversi momenti.

2. Generalità sul metodo

Sia per i saggi su effluenti che per quelli sul recettore, si utilizzano giovani esemplari di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) reperibili presso gli allevamenti ittici. Nel primo caso, almeno cinque gruppi di organismi vengono esposti ad altrettante diluizioni di uno scarico e, al termine del periodo di esposizione, il numero di pesci deceduti nei diversi gruppi viene utilizzato per determinare la diluizione letale per il 50% degli organismi (LC_{50}).
Anche nel caso del corpo idrico recettore si può esaminare una serie di diverse diluizioni, ma più spesso si ricorre ad un unico campione non diluito, poichè, raramente, il corpo idrico dà luogo a effetti tossici acuti di tale entità da permettere di valutare la relazione "concentrazione-risposta". Il risultato si limita, in questo caso, alla percentuale di organismi deceduti ed all'esame statistico della sua significatività.

3. Conduzione del saggio

3.1 Materiali e strumentazione

Oltre alla comune strumentazione di laboratorio, la conduzione del saggio di tossicità richiede:

- vasche o recipienti in vetro aventi capacità netta di 5 L e che consentano di mantenere un livello del liquido non inferiore a 15 cm; l'adozione di volumi diversi deve sempre soddisfare il limite di carico di biomassa che è fissato al valore massimo di 0,5 $g/L \cdot giorno^{-1}$;
- retini di varie dimensioni per il trasferimento dei pesci;
- reti o coperture trasparenti in materiale atossico per evitare la fuoriuscita degli animali dalle vasche;
- un dispositivo atto alla termostatazione delle soluzioni a 15±1°C. Il condizionamento dell'ambiente di lavoro o l'immersione dei recipienti di saggio in bagni termostatati sono tra le soluzioni più comunemente adottate;
- ove possibile, detto ambiente potrà essere attrezzato con un sistema di lampade fluorescenti ad ampio spettro provvisto di temporizzatore e preferibilmente di un dispositivo per la transizione graduale tra le fasi di luce e di buio;
- analizzatore di ossigeno disciolto;
- sistema di aerazione a bassa pressione fornito di diffusori a pietra porosa o cannule in vetro. Oli ed altri vapori organici sono contaminanti frequenti degli impianti ad aria compressa e devono essere rimossi con filtri di carbone attivo.

I materiali di fabbricazione di vasche, tubi od altro oggetto destinato ad entrare in contatto con i campioni da saggiare o con l'acqua di diluizione e di mantenimento, devono essere scelti accuratamente. Il vetro borosilicato e le plastiche florurate dovrebbero essere impiegati ovunque possibile al fine di minimizzare l'assorbimento e il rilascio di sostanze tossiche. Gli oggetti costruiti con questi materiali possono essere riutilizzati dopo le necessarie procedure di pulizia. Materie plastiche quali il polietilene, il polipropilene, il Tygon®, o altre ancora, possono trovare usi limitati come nel prelievo e nel trasporto dei campioni da saggiare, ma non devono essere riutilizzate. Al contrario, contenitori costruiti con questi materiali, con polietilene ad alta densità in particolare, ben si prestano ad essere specificamente riutilizzati per conservare acque di diluizione o acque sintetiche preparate in laboratorio. La fibra di vetro può essere impiegata per le vasche di mantenimento dei pesci come pure per la conservazione di grossi volumi di acqua. In ogni caso si raccomanda che a prescindere dalla natura dei materiali prescelti, sia i recipienti che gli accessori vengano sciacquati accuratamente, meglio se in flusso continuo, con l'acqua di diluizione o di mantenimento prima del loro impiego nei saggi.

3.2 Organismi per il saggio

Per la conduzione del saggio devono essere utilizzati i giovani esemplari di trota iridea (*O. mykiss*) il cui stadio vitale può variare tra l'organismo che si nutre autonomamente da almeno un paio di settimane (≥0,1 g; circa 2 cm) fino a quello avente lunghezza inferiore ai 6 cm, il cui peso dovrebbe risultare inferiore ai 3 g. Qualora siano disponibili più gruppi di organismi rispondenti a tale requisito, si dovrà sempre privilegiare lo stadio più precoce. Gli stadi più precoci consentono infatti di rispettare più facilmente il rapporto "peso dei pesci/volume di soluzione". Questo rapporto non deve essere superiore a 0,5 g/L se le soluzioni sono rinnovate giornalmente, od anche 0,25 g/L se si effettua il rinnovo con la frequenza minima prevista di 48 ore (0,5 $g/L \cdot d^{-1}$). In ogni caso, le dimensioni degli organismi devono essere il più possibile omogenee e tali che, per uno stesso saggio, la lunghezza delle trotelle più grandi dovrebbe essere inferiore al doppio di quella delle più piccole (EPS, 1990).
In base alle condizioni esistenti in troticultura o a quelle di mantenimento in laboratorio, può essere necessario acclimatare gli organismi alle condizioni previste per il saggio tossicologico (vedi Appendice). Considerando che un saggio può articolarsi in una prova preliminare ed in una definitiva, il numero di organismi necessari a completare la sperimentazione e che eventualmente, dovrebbero essere acclimatati, si aggira sul centinaio.
Gli organismi sopravvissuti ad un saggio non potranno venire riutilizzati in prove successive.

3.3 Acqua di diluizione

Le diverse diluizioni di un effluente sono preparate usando, quale acqua di diluizione, la stessa a cui sono state acclimatate le trotelle. In funzione delle finalità del saggio si potranno scegliere diverse soluzioni. In particolare:

a) Se lo scopo è di evidenziare la presenza di effetti tossici acuti e il loro andamento nel tempo o fare confronti tra la tossicità di diversi effluenti, si adotterà un'acqua sintetica (standard), avente durezza di circa 150 mg/L $CaCO_3$ per la cui preparazione si aggiungono sali di grado analitico ad acqua ultrapura. Per un litro di acqua standard si solubilizzano nell'ordine: 10 mg di KCl, 192 mg di $NaHCO_3$, 53 mg di $MgSO_4$ e 183 mg di $CaSO_4 \cdot 2H_2O$. Il mezzo così ottenuto ha le seguenti caratteristiche: pH 7,5-8,5, durezza 140-160 mg $CaCO_3$/L, alcalinità 110-120 mg $CaCO_3$/L, Ca/Mg >1 e prossimo a 4, Na/K >1 e prossimo a 10.
b) Se lo scopo del saggio è di valutare la tossicità acuta dell'effluente nelle acque del recettore, si userà l'acqua non contaminata dello stesso (se non tossica), prelevata a monte dell'immissione o al di fuori dell'area esposta a fonti di contaminazione. Nel caso essa non sia disponibile, si può utilizzare un'acqua prelevata da un altro corpo idrico superficiale od un'acqua sintetica aventi approssimativamente le stesse caratteristiche chimiche e, in particolare, la stessa durezza del corpo idrico recettore. In qualche caso è anche possibile operare modifi-

cando la composizione di un'acqua naturale, purchè di qualità adeguata, previa aggiunta di sali (reagenti di grado analitico) e nelle quantità necessarie. Il prelievo di acque naturali deve essere effettuato immediatamente prima del loro impiego e comunque non oltre le 96 ore dallo stesso, mantenendo refrigerati i campioni (4°C) quando se ne faccia uso a più di 24 ore dalla raccolta.

c) Se, infine, lo scopo del saggio è quello di esaminare gli eventuali effetti additivi dei contaminanti presenti nello scarico e di quelli presenti nel recettore, come acqua di diluizione si userà quella del recettore, indipendentemente dal suo grado di contaminazione, prelevata a monte o al di fuori dell'influenza dello scarico in esame. In questo caso è necessario aggiungere un gruppo di organismi di controllo esposti alla sola acqua di mantenimento o di acclimatazione.

3.4 Illuminazione

Durante il saggio vengono mantenute le stesse condizioni di illuminazione cui gli animali sono stati acclimatati. Pertanto il fotoperiodo consigliato è di circa 16 ore di luce e 8 ore di buio. Deve essere evitata la luce solare diretta optando invece per le intensità luminose pari a quelle comunemente riscontrabili nei laboratori (500-1000 lux) o più attenuate.

3.5 Temperatura

La temperatura delle soluzioni da saggiare deve essere mantenuta a 15±1°C per tutta la durata delle prove.

3.6 Alimentazione

La somministrazione di cibo viene interrotta 24 ore prima dell'inizio del saggio durante il quale gli organismi non vengono alimentati.

3.7 Ossigeno disciolto

È necessario misurare quotidianamente la concentrazione di ossigeno disciolto ma più frequentemente durante le prime ore dall'avvio del saggio. Essa deve risultare ≥60% del valore di saturazione.
Nei test statici è frequente, soprattutto alle concentrazioni più elevate di effluente di scarico, che l'ossigeno disciolto scenda al di sotto del limite indicato. È necessario in questi casi aerare le soluzioni del saggio facendovi gorgogliare aria priva di contaminanti utilizzando diffusori di spugna di vetro, pipette di vetro o, se compatibili, anche diffusori a pietra porosa. Compatibilmente con il tenore di ossigeno richiesto, l'aerazione deve essere regolata sul minimo flusso possibile, sia per non disturbare gli organismi che per minimizzare la perdita di eventuali tossici volatili.

4. Procedura di saggio con diluizione (effluente)

4.1 Saggio preliminare

Quando ci si appresta alla conduzione di un saggio con un effluente di qualità sconosciuta, può essere consigliabile, ma non vincolante ai fini procedurali, acquisire dati preliminari sulla sua potenzialità tossica. Il saggio preliminare, normalmente impiegato a tale scopo, consiste in una prova a breve termine con almeno cinque diluizioni di scarico che siano ampiamente spaziate tra loro secondo una serie geometrica. Le diluizioni di effluente, comunemente espresse come percentuali di effluente sul totale della soluzione da saggiare (v/v), possono essere indicativamente le seguenti: 100%, 10%, 1%, 0,1% e 0,01% più un controllo con sola acqua di diluizione. Per ciascuna soluzione, saggiata in una sola replica, vengono utilizzati 5 organismi ed il tempo di esposizione è limitato alle 24 ore. Al termine della prova è generalmente possibile individuare un ambito di tossicità acuta definito, ad un estremo, dalla completa mortalità

degli organismi, ed all'estremo opposto dalla loro completa sopravvivenza. Se lo stesso campione di scarico dovrà essere poi impiegato anche nel saggio definitivo, è opportuno che i tempi di campionamento e di conservazione siano correttamente calcolati.
Si deve tenere presente che il saggio definitivo e quello preliminare possono dare risultati significativamente diversi e sostanzialmente per due motivi: a) poichè il saggio definitivo ha una durata superiore (96h) a quella del preliminare e b) poichè le due prove possono essere condotte con campioni prelevati in tempi diversi che, come conseguenza della variabilità degli scarichi, possono avere contenuti di tossici anche molto differenti.

4.2 Saggio definitivo

Per condurre la prova definitiva si preparano almeno 5 diluizioni del campione di effluente più un controllo con acqua di diluizione. Esse vengono allestite in due repliche da 5 litri ciascuna e, fatta eccezione per particolari intervalli di tossicità evidenziati con il test preliminare, le diluizioni di effluente di scarico comunemente adottate sono le seguenti:

100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25% (v/v)

Queste diluizioni sono in serie geometrica, con fattore di diluizione pari a 0,5. Secondo questa procedura il test definitivo richiede un volume di circa 40 L di effluente di scarico essendo previsto almeno un rinnovo delle soluzioni allo scadere delle 48 ore. Indicazioni più precise sul volume da prelevare non possono essere date in quanto detto volume dipende dal grado di tossicità del campione e dalla taglia degli organismi disponibili per il saggio (vedi Paragrafo 3.2).
Se dopo 1-2 ore dall'avvio del saggio si osserva la completa mortalità degli organismi alle concentrazioni più elevate (100% e 50%), si consiglia di aggiungere altre concentrazioni alla serie indicata, quali 3,1%, 1,5%, 0,75%. I tempi di osservazione degli effetti causati dalle concentrazioni aggiunte andranno adeguati in base al ritardo di allestimento.
La pratica di cumulare i risultati ottenuti dalle repliche di ogni diluizione fa sì che il loro allestimento risponda solo a requisiti di tipo pratico, quali la facilità di osservazione degli organismi, il più facile controllo del carico di biomassa per litro di soluzione o la possibilità di non perdere completamente il risultato di una diluizione qualora l'unica replica andasse perduta o scartata per un qualsiasi motivo. Se, tuttavia, altre motivazioni pratiche risultassero prioritarie (spazio limitato, eccessivo numero di recipienti ecc.), le cinque diluizioni del saggio possono essere allestite in unica replica adeguando di conseguenza i volumi e il numero di organismi.
I volumi necessari alla conduzione del saggio vengono prelevati dai contenitori, previo accurato mescolamento, e portati alla temperatura di 15±1°C. Preparate le diluizioni previste, si misura la concentrazione di ossigeno disciolto e se questa risultasse inferiore al limite del 60% del valore di saturazione si procede ad aerare i contenitori (vedi Paragrafo 3.7). Quando le soluzioni hanno raggiunto le condizioni indicate si introducono gli animali. Si raccomanda che il trasferimento degli organismi dalla vasca di acclimatazione ai contenitori del saggio venga effettuato con gli appositi retini, rapidamente e con la massima cura, al fine di minimizzare lo stress e non danneggiare gli organismi. Si raccomanda inoltre che l'ordine di trasferimento sia secondo una sequenza casuale, evitando, per esempio, di completare una diluizione per passare poi alle successive. Subito dopo il trasferimento i recipienti dovranno essere coperti con reti o coperture trasparenti per impedire la fuoriuscita degli organismi.
A 24, 48, 72 e 96 ore si registrano e si rimuovono gli organismi deceduti. Sono considerati tali quei pesci che non dimostrano movimenti opercolari o che non reagiscono ad una leggera stimolazione. Può essere utile registrare ogni altra alterazione osservabile quale il cambiamento della colorazione, la perdita di equilibrio, il nuoto scoordinato, l'aumentata velocità respiratoria ed altre ancora.
Allo scadere delle 48 ore di esposizione si procede al rinnovo delle soluzioni ed al trasferimento in queste ultime delle trotelle che già sono state esposte per 48 ore alle diluizioni corrispondenti di effluente. In presenza di tossici facilmente ossidabili o degradabili o se l'eventuale aerazione aumenta la velocità di tali processi, può essere opportuno rinnovare giornalmente le soluzioni.
Il saggio di tossicità acuta termina allo scadere delle 96 ore.

5. Procedura di saggio senza diluizione (corpo idrico)

5.1 Saggio definitivo

Per il saggio di tossicità acuta sulle acque di un corpo idrico recettore, generalmente si espongono gli esemplari di trota a un campione non diluito.
In questo tipo di saggio i giovani organismi devono essere acclimatati ad un'acqua naturale, semisintetica o sintetica che sia simile a quella del corpo idrico da saggiare almeno per la sua durezza totale (per l'acclimatazione vedi Appendice). Come precisato nella metodica per saggi su effluenti di scarico, anche in questo caso l'acqua di acclimatazione delle trote viene usata per l'allestimento della prova di controllo.
A differenza del saggio con effluenti, il campione del corpo idrico recettore viene saggiato in quattro repliche ed altrettante ne vengono allestite per l'acqua di controllo. In ciascuna replica vengono trasferiti 10 organismi.
In questo saggio i risultati delle repliche non vengono cumulati e, al contrario, contribuiscono a determinare se la mortalità eventualmente osservata nel campione è significativa. Per l'allestimento e la conduzione del saggio sul corpo idrico valgono tutte le indicazioni date per quello sugli effluenti.
Se il campione non diluito dell'acqua del corpo recettore causa una mortalità superiore al 50% degli organismi esposti, si può procedere alla stima del grado di tossicità delle sue acque e cioè all'esame della relazione dose-risposta. A questo scopo si procede esattamente come per il saggio su un effluente. In questo caso può essere preferibile definire la serie delle 5 diluizioni secondo un fattore di diluizione >0,5.

6. Validità del saggio

I risultati dei saggi non sono validi se tra gli organismi del controllo si osserva una mortalità >10% o se la concentrazione di ossigeno disciolto in una qualsiasi soluzione del saggio scende al di sotto del 60% del valore di saturazione.
Pur senza vincolare la validità del risultato, periodicamente si consiglia la conduzione di saggi in condizioni standard con un tossico di riferimento, quale ad esempio il bicromato di potassio o il pentaclorofenolo. Questa pratica dovrebbe consentire di evidenziare condizioni sperimentali o lotti di organismi, per qualche motivo, anomali. In condizioni normali, disponendo di una congrua serie di LC_{50}, il risultato di ogni nuovo saggio di riferimento dovrebbe collocarsi entro l'intervallo definito dal valore medio di tale serie e dal doppio del corrispondente scarto tipo (media±2·scarto tipo). Viceversa, se la LC_{50} del tossico di riferimento si colloca all'esterno di questo intervallo di sicurezza, tutti i dati ottenuti con il medesimo lotto di organismi dovrebbero essere considerati con cautela.
Con valore puramente indicativo vengono citati i risultati ottenuti in prove di intercalibrazione rispettivamente tra 10 e 12 laboratori (US EPA, 1985). I tossici scelti per questo studio furono l'argento nitrato e l'endosulfan ed i risultati ottenuti, in termini di 96hLC50, dimostrarono un coefficiente di variazione per il primo tossico pari a 64% e 32% e per il pesticida, pari a 50% e 43%. Il primo dato di ciascuna coppia è stato ottenuto con saggi condotti in condizioni statiche mentre il secondo in flusso continuo. Può essere utile, infine, disporre di alcune informazioni sulla tossicità acuta del $Cr^{(VI)}$. In funzione della durezza dell'acqua di diluizione e della dimensione degli organismi, questo metallo dimostra delle 48-96hLC_{50} variabili tra 7,6 mg/L e 79,6 mg/L (EIFAC, 1983). Indicativamente, minore è la durezza del mezzo o la dimensione degli organismi e maggiore è la tossicità del cromo esavalente.

7. Analisi dei risultati

7.1 Calcolo della LC_{50}

Il saggio per la valutazione della tossicità acuta descritto in questa procedura si propone non solo l'identificazione delle sorgenti di contaminazione capaci di effetti tossici acuti ma anche la

quantificazione della loro potenziale tossicità mediante la stima della concentrazione letale al 50% degli organismi (LC_{50}) per un dato tempo di esposizione (24-48 ore). La determinazione della LC_{50} può essere effettuata con diversi metodi la cui applicabilità è in buona parte dipendente dal tipo di risultati ottenuti, e più precisamente dal numero di effetti parziali osservati, intermedi cioè tra la mortalità 100% e la mortalità nulla. La valutazione della LC_{50} dovrebbe basarsi sui risultati relativi ad almeno 5 concentrazioni di campione ed un controllo, sebbene molti metodi di analisi possono essere utilizzati con un numero di dati inferiore. Se la massima concentrazione saggiata ha causato una mortalità inferiore al 50%, non si dovrebbe procedere al calcolo della LC_{50}, il cui valore sarebbe in tal caso poco attendibile. Meglio ripetere il saggio, se possibile, cercando di migliorare la serie delle concentrazioni saggiate. In caso contrario la LC_{50} sarà più correttamente espressa come "maggiore della massima concentrazione sperimentata" (es.: $48hLC_{50}>80\%$).
Nella Sezione 8020 per la valutazione della tossicità acuta con *Daphnia magna* sono stati proposti tre diversi metodi, ampiamente validati, atti alla valutazione della LC_{50}. Si tratta del metodo di Litchfield e Wilcoxon, del test binomiale e del metodo "probit". Essi sono adeguatamente illustrati nell'ambito della Sezione 8020 al quale si rinvia. Infine, è opportuno segnalare che sono disponibili in commercio alcuni programmi per personal computer espressamente dedicati a diversi metodi di analisi statistica di risultati tossicologici, a questi prodotti parimenti si rinvia.

7.2 Effetti da concentrazione unica

L'esame dei risultati ottenuti saggiando un campione non diluito del corpo idrico è riconducibile alla teoria del confronto tra due campioni. Nel presente schema sperimentale, i decessi osservati nelle repliche del corpo idrico e in quelle del controllo rappresentano le due serie di dati posti a confronto.
Di fatto, se la mortalità degli organismi esposti al corpo idrico supera il valore del 10%, e cioè quel limite di decessi accettato come "naturale" in un gruppo di individui di controllo, si può già concludere che il campione contiene inquinanti a concentrazioni tossiche. Tuttavia può essere opportuno dare supporto statistico al risultato del saggio, verificando la cosiddetta ipotesi nulla o zero, e cioè che le medie dei decessi osservati nei due trattamenti siano uguali. Smentire l'ipotesi con un certo grado di probabibilità, solitamente P=0,05, equivale a verificare che la mortalità osservata per gli organismi esposti al corpo idrico è significativa.
Il test "*t*" è utilizzato per confrontare i due campioni e, dal momento che vi è un'attesa di contaminazione o di mortalità maggiore per il campione del corpo idrico piuttosto che per il controllo, un test unilaterale è generalmente adeguato. L'applicazione del test "*t*" richiede che le proporzioni di decessi osservati nelle repliche siano distribuite normalmente. Se i dati soddisfano questo requisito è necessario procedere anche alla verifica di omogeneità della varianza dei due gruppi di risultati e solo in caso affermativo è lecito passare all'esame della significatività dei decessi osservati. Se i dati non fossero distribuiti normalmente il problema viene comunemente risolto mediante opportune trasformazioni dei dati stessi. La conversione delle proporzioni di organismi deceduti nella radice quadra del loro arc sen è la trasformazione più comune. Se non si rivelasse risolutiva è necessario procedere all'esame dei risultati con metodi non parametrici. Se, a sua volta, la condizione di omogeneità della varianza non fosse rispettata, il test "*t*" rimane valido ma deve essere applicato in forma modificata. Il valore calcolato per la funzione "*t*" è infine confrontato con il valore critico di "*t*" individuabile in apposite tabelle, in base al numero di gradi di libertà ed al livello di probabilità prescelto. Se il valore di "*t*" calcolato supera il valore tabellare, le due mortalità sono significativamente diverse. Fortunatamente sono disponibili in commercio dei programmi per personal computer che sono espressamente dedicati all'analisi statistica dei risultati tossicologici e possono svolgere tutte le operazioni necessarie. A questi prodotti pertanto, si rinvia.

APPENDICE

A1 - Note sulla sistematica e sulla "biologia" di trota iridea

La trota iridea è originaria dei corsi d'acqua montani della costa ovest degli Stati Uniti. Al di

fuori del continente americano, questa specie è stata introdotta in moltissimi paesi tra cui, nel secolo scorso anche in Italia (Welcomme, 1988), spesso per la pesca sportiva, causando talvolta la scomparsa di specie native, e poi rapidamente adottata in acquacoltura il che l'ha resa una delle specie più diffusamente allevate in tutto il globo.
Recentemente, la validità del genere *Salmo* è stata messa in dubbio per alcune specie di trota nord americane, considerate, invece, molto più affini alle specie di salmoni del Pacifico appartenenti al genere *Oncorhynchus*. In base ai dati presentati da Smith e Stearly (1989), la American Fisheries Society ha adottato per la trota iridea il nome specifico di *Oncorhynchus mykiss* in sostituzione del precedente *Salmo gairdneri*.
Gli ambienti naturali in cui vive preferenzialmente la specie, hanno temperature variabili tra i 3°C e i 21°C, ma l'intervallo ottimale è situato tra 10 e 16°C. Gli estremi di temperatura ai quali la trota può essere gradualmente acclimatata, generalmente ne inibiscono l'accrescimento.
Negli individui adulti, la temperatura e il fotoperiodo sono i fattori ambientali che regolano l'induzione dell'attività riproduttiva. La trota iridea ha originalmente attività riproduttiva primaverile (US EPA, 1985), tuttavia essa può riprodursi anche all'inizio del periodo estivo o di quello invernale in relazione al clima della regione, all'altitudine, al ceppo genetico. In ogni caso, nelle troticolture commerciali, dove la riproduzione è solitamente invernale, sono stati isolati dei ceppi di individui capaci ormai di riprodursi in tutto l'arco dell'anno, assicurando una disponibilità pressochè continua di stadi giovanili.
L'avannotto ha lunghezza compresa tra 15 e 20 mm ed è provvisto di un grosso sacco vitellino le cui riserve vengono esaurite nell'arco di 180-220 gradi-giorno. Al riassorbimento del sacco vitellino, l'avannotto comincia a nutrirsi attivamente predando, in natura, varie specie di invertebrati. Negli allevamenti commerciali l'alimentazione è basata solo sui mangimi pellettati secchi che, proposti in varie composizioni e dimensioni del pellet, soddisfano l'esigenza di una rapida crescita a costi contenuti. Gli individui di sesso maschile raggiungono la maturità sessuale nell'arco di 2 anni mentre raramente quelli di sesso femminile producono uova prima del terzo anno di vita. A questo stadio del ciclo vitale, il loro peso medio si aggira tra i 300 e 500 g (Giordani, 1972) ma pesi superiori sono frequenti. Verso il quarto anno di vita hanno lunghezza corporea tra 35 e 40 cm, ma individui più anziani possono raggiungere anche taglie eccezionali prossime ai 70 cm e ai 7 kg ed oltre di peso. Nelle popolazioni naturali, tali valori sono comunque molto variabili e legati spesso all'ambiente, se lentico o lotico, e alle varietà regionali.

A2 - Mantenimento degli organismi e acclimatazione

A2.1 Vasche e strumentazione

Oltre alla normale strumentazione di laboratorio, il mantenimento degli organismi richiede i contenitori e le apparecchiature descritte nel seguito.

- Vasche in materiale atossico, vetro e fibra di vetro sono da preferire. Il volume ed il numero delle vasche deve essere tale da consentire di stabulare il numero di pesci necessario in relazione alla frequenza dei saggi. In generale una o meglio due vasche in "tutto vetro", con un volume unitario di almeno 200 L, rappresentano una soluzione soddisfacente per una frequenza approssimativa di 3-4 saggi a settimana.
- Sistema di termoregolazione atto al mantenimento della temperatura nell'ambito di 15±1°C.
- Sistema di aerazione a bassa pressione fornito di diffusori a pietra porosa. L'aria insufflata deve essere priva di contaminanti. Oli ed altri vapori organici sono contaminanti frequenti degli impianti di aria compressa e devono essere rimossi con filtri di carbone attivo.
- Sistema di illuminazione realizzato con lampade fluorescenti, preferibilmente ad elevato indice di resa cromatica (>90) e che consenta di ottenere un'intensità luminosa, a livello delle vasche, tra i 500 e i 1000 lux. Il sistema deve es-

sere dotato di un temporizzatore per il controllo del fotoperiodo e, possibilmente, anche di un dispositivo che attui una transizione graduale (almeno 15 minuti) tra le fasi di luce e di buio.
- Analizzatore di ossigeno disciolto;
- Retini di varie dimensioni per i trasferimenti dei pesci.

Per la conduzione del saggio di tossicità deve essere utilizzato lo stadio giovanile di trota iridea. Più precisamente vengono impiegati gli organismi che abbiano completato il riassorbimento del sacco vitellino da almeno due settimane e che non abbiano superato la taglia di circa 6 cm. In ogni caso, le dimensioni degli organismi devono essere il più possibile omogenee. Gli animali allo stadio vitale richiesto, sono acquisibili presso allevamenti specializzati.

A2.2 Trasporto degli animali

Per il trasporto, le trotelle vengono comunemente mantenute in sacchi di plastica, parzialmente riempiti d'acqua (circa 1/3) e, per il volume restante, con ossigeno puro. Tale accorgimento, in genere, permette di conservare elevate concentrazioni di ossigeno disciolto nel mezzo acquoso per l'intera durata del trasporto (qualche ora). Nella stagione calda dovranno essere adottati accorgimenti volti all'isolamento o, se necessario, anche al raffreddamento dei sacchi contenenti gli avannotti (materiale espanso, ghiaccio ecc.). Per evitare pericolosi sbalzi termici, all'arrivo in laboratorio i sacchi, ancora chiusi, verranno lasciati galleggiare nelle vasche di mantenimento per il tempo necessario al raggiungimento della temperatura dell'acqua di destinazione. Solo allora si potranno trasferire gli organismi.

A2.3 Acqua di mantenimento e di acclimatazione

Per il mantenimento delle trotelle è preferibile disporre di un sorgente continua di acqua non contaminata. La rete idropotabile, la falda o anche un corpo idrico superficiale possono rappresentare tale sorgente ed essere utilizzati per approvvigionare le vasche di mantenimento in flusso continuo. Orientativamente, sono da preferire acque con durezza compresa tra 50 e 250 mg/L $CaCO_3$ e pH tra 6,0 e 8,5. Se necessario, lo stoccaggio, l'aerazione prolungata, il trattamento con carbone attivo e l'irraggiamento con luce ultravioletta, possono migliorare sensibilmente la qualità dell'acqua. La presenza di cloro residuo, a causa dell'elevata tossicità per la vita acquatica, è il problema più comunemente associato all'uso dell'acqua di rete. Si raccomanda, pertanto, di verificarne il contenuto ed eventualmente intervenire con i trattamenti indicati per ridurne la concentrazione ad un valore compatibile con la sopravvivenza degli animali (≤0,011 mg/L; ASTM, 1993).
Le caratteristiche chimiche e fisiche dell'acqua possono variare nel tempo. È opportuno controllare con la necessaria frequenza alcuni parametri come la durezza, il pH, la conducibilità, l'alcalinità, l'ammoniaca e il carbonio organico. Con frequenza minore, potranno essere misurati i metalli e i pesticidi o altri specifici contaminanti. A titolo d'esempio in Tab. 1 sono riportati i valori (guida) di alcuni dei parametri misurabili in base ai quali un'acqua è considerata accettabile.
Quando per la conduzione del saggio è necessario utilizzare un'acqua di diluizione, sia essa naturale o sintetica, avente una durezza che differisce più del 20% dall'acqua di mantenimento, le trotelle devono venire acclimatate a tale durezza (EPS, 1990). Non rispettando questa procedura vengono vanificati i vantaggi derivanti dall'adozione di acque standard o di recettore non contaminato. La durata del periodo di acclimatazione non può essere definita in modo univoco. In ogni caso è consigliabile che l'acqua della vasca di acclimatazione venga cambiata gradualmente, passando, in un tempo minimo di due giorni, dal "100% acqua di mantenimento" al "100% acqua di acclimatazione". Similmente, per gli eventuali cambiamenti di temperatura si deve procedere in modo che la variazione non superi il limite di 3°C/giorno. A trasferimento completato, farà seguito un periodo 7 giorni, ma preferibilmente di durata superiore, nel corso del quale gli animali verranno mantenuti nello stesso tipo di acqua e alle stesse condizioni impiegate per il saggio tossicologico.
Quando l'acqua di mantenimento ha durezza elevata, l'acqua semi-sintetica può essere otte-

nuta per diluizione con acqua deionizzata. Viceversa si può operare con aggiunta di sali (reagenti di grado analitico) alla stessa acqua di mantenimento o ad acqua deionizzata. È conveniente preparare l'acqua sintetica in quantità adeguate da conservare, soprattutto se si usa acqua deionizzata, per un periodo di qualche giorno in aerazione moderata prima dell'uso.
È raro disporre di volumi d'acqua sintetica, semi-sintetica o di recettore non contaminato in quantità tali da alimentare la vasca di acclimatazione in flusso continuo. Ne consegue che la procedura di acclimatazione deve essere completata necessariamente in condizioni semistatiche. Ciò significa che durante l'acclimatazione si procede quotidianamente a rinnovi parziali (circa 50%) dell'acqua della vasca di acclimatazione. È consigliabile associare il rinnovo del mezzo alla pulizia della vasca (per sifonamento), dopo la somministrazione del cibo in modo da rimuovere anche i residui di quest'ultimo. Nella fase di acclimatazione, un considerevole risparmio di acqua è conseguibile con l'adozione di un sistema di filtraggio biologico simile agli acquari ornamentali, che evitando l'accumulo di cataboliti fa si che la vasca possa operare in condizioni di riciclo. Qualunque sia la soluzione adottata, ammoniaca e nitriti debbono essere misurati frequentemente per assicurarsi che non raggiungano livelli tossici per gli organismi. Concentrazioni ≤0,02 e ≤0,06 mg/L di ammoniaca non ionizzata e di nitriti, rispettivamente, sono considerate di sicurezza per la tutela della vita acquatica (EPS, 1990). Similmente, ASTM (1993) suggerisce che la concentrazione di ammoniaca non ionizzata nelle vasche di mantenimento e di acclimatazione non superi il valore di 0,035 mg/L (15°C e pH 8,0 - 9,0).
Sia nelle vasche di mantenimento che, a maggior ragione, nelle vasche di acclimatazione, non si devono superare determinati valori di densità degli organismi. Orientativamente può essere suggerito un carico di biomassa prossimo a 0,5 g/L (peso fresco) in condizioni semistatiche, mentre in flusso continuo possono essere mantenuti carichi maggiori, dell'ordine di 1 g/L con un flusso che garantisca almeno tre ricambi al giorno. Con flussi d'acqua superiori, che sono generalmente da preferire, si possono mantenere a parità di carico unitario, molti più organismi nella stessa vasca o, viceversa, densità minori con miglioramento delle condizioni di mantenimento. In generale sono da evitare le condizioni di sovraffollamento che inducono stress e mortalità elevate.

A2.4 Ossigeno disciolto

Sia nelle vasche di mantenimento che di acclimatazione deve essere mantenuto un contenuto di ossigeno disciolto ≥80% del valore di saturazione. A tale scopo si collocano sul fondo delle vasche dei diffusori a pietra porosa attraverso i quali si fa gorgogliare con flusso moderato ma continuo, l'aria priva di contaminanti, fornita da un sistema di aerazione a bassa pressione.

A2.5 Pulizia e disinfezione

Le vasche e gli accessori in uso devono essere mantenuti in buone condizioni di pulizia. Lo scopo è di minimizzare i rischi di insorgenza di malattie e di contribuire alla elevata qualità delle condizioni di mantenimento. La rimozione mediante sifonamento delle feci e del cibo non consumato deve essere almeno quotidiana. È consigliabile la disinfezione delle vasche e degli accessori prima dell'introduzione di ogni nuovo lotto di organismi. Disinfettanti a base di ipoclorito, aldeide formica, composti clorurati e iodofori od altri ancora possono essere utilizzati a questo scopo. Si tenga presente tuttavia che essi possono essere molto tossici anche per i pesci e pertanto, a disinfezione ultimata, sia le vasche che gli accessori devono essere sciacquati molto accuratamente.

A2.6 Alimentazione

I giovani esemplari di trota iridea devono essere nutriti con diete commerciali aventi composizione idonea alle esigenze nutrizionali di questo salmonide. Si tratta generalmente di mangimi secchi pellettati e cioè preparati in cilindretti che hanno dimensione adeguata alla taglia del pesce. I lotti di mangime hanno un termine di conservabilità oltre il quale si ha un decadimento del valore nutrizionale.
La somministrazione del cibo può essere quotidiana o a giorni alterni, mentre la sua quantità

dipende dalle dimensioni dei pesci e dalla temperatura dell'acqua ed è solitamente indicata in tabelle fornite dal produttore del mangime stesso. Fatta eccezione per precise esigenze sperimentali, è opportuno che la scelta del mangime privilegi quello in uso presso la troticoltura di provenienza degli animali, evitando in tal modo di dover acclimatare gli stessi ad una nuova dieta. L'alimentazione viene sospesa 24 ore prima della conduzione del saggio.

A2.7 Mortalità e patologie

Nelle 24-48 ore successive all'arrivo degli organismi in laboratorio, è comune osservare dei decessi dovuti allo stress da trasporto. Solo al termine di questa fase, nella quale i decessi possono essere anche nulli se il trasporto è stato eseguito correttamente, si comincia a registrare la mortalità degli organismi con particolare attenzione per la settimana di acclimatazione che precede la conduzione del saggio. Se la mortalità supera il 10%, il lotto deve essere scartato; se è compresa tra il 5 e il 10% è consigliabile prolungare l'acclimatazione per altri 7 giorni, mentre se è inferiore al 5% il lotto può essere utilizzato.
Sia durante il mantenimento che l'acclimatazione, gli organismi devono essere ispezionati quotidianamente per individuare eventuali sintomi di affezioni patologiche in corso o per rimuovere i pesci deceduti. Superate le conseguenze del trasporto, ogni alterazione del comportamento degli avannotti è generalmente un segnale di cattive condizioni di salute. La distribuzione anomala di alcuni organismi nelle vasche, il rifiuto del cibo, la colorazione scura, le pinne sfrangiate o corrose, le alterazioni del nuoto, la presenza di rigonfiamenti, di deformità, di macchie o ulcerazioni sulle pinne o sulla cute sono tutti sintomi di patologie in corso. Sebbene un intervento terapeutico sia spesso possibile esso è sconsigliato, perlomeno rispetto alla possibilità di un successivo impiego degli organismi nel saggio. In questo caso si procede a scartare il lotto, disinfettare le vasche e riacquistare un nuovo gruppo di organismi.

BIBLIOGRAFIA

ASTM (1993): "*Standard guide for conducting acute toxicity tests with fishes, macroinvertebrates and amphibians*", Annual Book of ASTM Standards, Sec.11, Water and Environmental Techonology, E 729 - 88a.

EIFAC (1983): "*Report on chromium and freshwater fish*", European Inland Fisheries Advisory Commission, Working Party on Water Quality Criteria for European Freshwater Fish,. EIFAC Tech. Pap. n.43, 31pp.

EPS (1990): *"Biological test method. Reference method for determining acute lethality of effluents to rainbow trout*", Environ. Prot. Series, Conservation and Protection, EPS 1/RM/13, Ottawa, Ontario, Canada.

GIORDANI G. (1972): *"Idrobiologia e piscicoltura"*. Edagricole, Bologna, 292 pp.

OECD (1984): "*Guidelines for testing of chemicals. Fish acute toxicity test*"; Guideline 203. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.

SMITH G.R. & STEARLY R.F. (1989): "The classification and scientific names of rainbow and cutthroat trouts", *Fisheries* , **14**, 4-10.

US EPA (1985): "*Methods for measuring the acute toxicity of effluents to freshwater and marine organisms*", W.H. Peltier C.I. Weber, U.S. Environmental Protection Agency, Report EPA/600/4-85/013, Cincinnati, OH.

WELCOMME R.L. (1988): "*International introductions of inland aquatic species*", FAO Fish. Tech. Pap., 294, 318 pp.

8090. Metodo di valutazione della tossicità cronica (7 giorni) con *Mysidopsis bahia*

1. Introduzione

È descritta la procedura standard per condurre un saggio atto a stimare la tossicità cronica, più esattamente sub-cronica, di effluenti di scarico o di acque naturali sul crostaceo marino *Mysidopsis bahia*.
La mancata osservazione di effetti cronici con un dato campione non esclude il riscontro di effetti tossici in campioni prelevati in momenti diversi, e ciò a causa della possibile variabilità di uno scarico come pure della capacità di diluizione delle acque recettrici o anche della variabilità delle sorgenti di contaminazione diffuse che nel recettore trovano recapito.

2. Generalità sul metodo

Giovani esemplari di 7 giorni di età del crostaceo marino *Mysidopsis bahia* sono esposti ad uno scarico acquoso o all'acqua di mare di un'area indagata, con lo scopo di evidenziare se sono presenti sostanze tossiche a concentrazioni tali da causare effetti di tipo cronico. La procedura di saggio per un effluente richiede che un minimo di cinque gruppi di giovani organismi sia esposto ad altrettante concentrazioni del campione da saggiare, per un arco di tempo di 7 giorni. Al termine della sperimentazione, vengono esaminati la sopravvivenza, l'accrescimento e la fecondità dei cinque gruppi sperimentali, si esaminano cioè quei parametri la cui riduzione è comunemente la manifestazione dell'effetto cronico di singole sostanze tossiche o di loro miscele. Il successivo confronto con i risultati di un gruppo di esemplari di controllo rende possibile individuare quella diluizione del campione che non inibisce significativamente (NOEC) l'accrescimento, la fertilità o la sopravvivenza dell'organismo. I dati relativi ad eventuali decessi possono anche essere elaborati per calcolare la diluizione del campione che è letale per una determinata percentuale di organismi (es. LC_{50}) e per tempi crescenti di esposizione, fino al limite dei 7 giorni della sperimentazione.
Una procedura analoga, che prevede cioè di saggiare diverse concentrazioni di campione, può essere adottata anche per lo studio della tossicità cronica delle acque dell'area recettrice. È, tuttavia, infrequente che i contaminanti raggiungono nelle sue acque delle concentrazioni così elevate da giustificare la diluizione del campione nel saggio di tossicità. Ne consegue che spesso si procede a saggiare l'acqua del recettore "tal quale" (non diluita), limitandosi a verificare se le eventuali risposte degli organismi così trattati si discostano significativamente da quelle del gruppo di organismi di controllo.

3. CONDUZIONE DEL SAGGIO

3.1 Materiali e strumentazione

La conduzione del saggio di tossicità richiede:

- numero minimo di 48 bicchieri di vetro borosilicato (beaker) con volume utile pari ad almeno 200 mL;
- lampade fluorescenti ad ampio spettro controllate da un temporizzatore, con il quale regolare il fotoperiodo, e possibilmente anche da un dispositivo che permetta la transizione graduale tra le fasi di luce e di buio;

- bagno o camera termostatati per il mantenimento della temperatura delle soluzioni da saggiare a 26-27°C per tutta la durata della sperimentazione;
- analizzatore di ossigeno disciolto;
- misuratore di salinità;
- fonte di aria compressa a bassa pressione con diffusori a pietra porosa o cannule di vetro. I piccoli aeratori usati in acquariologia rappresentano una soluzione adeguata. I compressori che comunemente alimentano gli impianti centralizzati, immettono oli e altri contaminanti nella rete di distribuzione che vanno rimossi con cartucce di carbone attivo o dispositivo analogo;
- 2-4 imbuti separatori con volume di 2 L per la schiusa di *Artemia salina;*
- cisti di *A. salina* che rispondono ai requisiti indicati in APPENDICE al "Metodo 8050 per la valutazione della tossicità acuta con *M. bahia*";
- 2 vasche, preferibilmente in tutto-vetro, con capacità di circa 20 L per il mantenimento dei neonati fino al 7° giorno di età;
- miscela di sali per la preparazione di acqua di mare artificiale. La miscela commercializzata con il marchio Forty Fathoms® ha dato buoni risultati nella conduzione dei saggi e nella coltura di *M. bahia*.

3.2 Organismi per il saggio

Si utilizzano individui appartenenti alla specie *Mysidopsis bahia* la cui età deve essere pari a 7 giorni e deve avere un ambito di variabilità il più possibile ristretto e certamente inferiore alle 24 ore.
I giovani individui di *M. bahia* sono ottenuti da femmine adulte secondo la procedura descritta nell'Appendice al Metodo 8050. Gli organismi appena nati (tempo 0) vengono trasferiti dalla vasca di schiusa ad una o più vasche di mantenimento aventi volume di circa 20 L, nelle quali gli organismi sono allevati fino all'età di 7 giorni, e cioè fino all'allestimento del saggio (Fig. 1). Le vasche sono mantenute in aerazione moderata, con rinnovi di almeno il 50% del mezzo ogni 48 ore e si raccomandano densità di individui ≤20/L. Giornalmente si somministrano naupli appena schiusi di *A. salina* (vedi Paragrafo 3.6) in quantità di circa 150 larve per ogni misidaceo, preferibilmente ripartiti in due momenti della giornata, di modo che alcu-

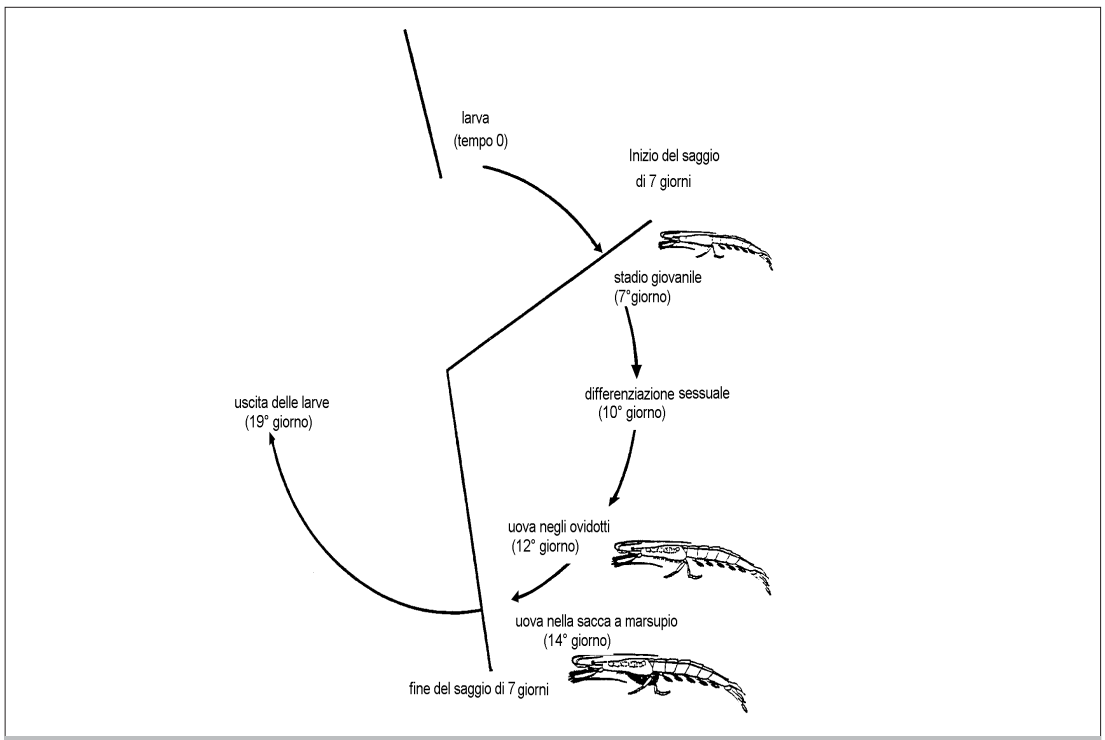


Figura 1: Test (sub)cronico di 7 giorni con il crostaceo M. bahia

ni naupli siano sempre disponibili all'interno delle vasche e, nel contempo, siano evitati deficit significativi della concentrazione di ossigeno disciolto. Il periodo di mantenimento fino all'età di 7 giorni può essere utilizzato per acclimatare gli organismi al valore di salinità a cui il saggio sarà condotto. Tale valore deve essere compreso tra 20 e 35‰. Le variazioni apportate al mezzo in questa fase di acclimatazione non devono superare il valore di 2‰ nell'arco di 24 ore. Se in laboratorio fossero disponibili più allevamenti mantenuti a diverse salinità, si sceglieranno i neonati prodotti da quello avente la salinità più prossima a quella del saggio.
Sia nel periodo di mantenimento che durante l'esecuzione del saggio la temperatura è un fattore molto importante poiché, regolando la velocità di sviluppo degli organismi, fa si che i tempi previsti per l'allestimento, la conduzione del saggio e le osservazioni di effetto sulla fertilità si dimostrino sperimentalmente corretti. A tale scopo la temperatura deve essere mantenuta a 26-27°C.

3.3 Acqua di diluizione

In base alle finalità del saggio, è opportuno scegliere il tipo di acqua di diluizione più adeguato.

a) Se l'obiettivo è di stimare la tossicità cronica di un effluente producendo un dato assoluto, indipendente dalle caratteristiche delle acque recettrici, è necessario operare in condizioni il più possibile standardizzate per quanto riguarda la salinità e l'acqua di diluizione. La salinità prevista per il saggio a 7 giorni in condizioni standard ha valore pari a 35‰. Per la preparazione dell'acqua di mare sintetica si suggerisce l'uso di miscele di sali già pronte e disponibili in commercio, quale ad esempio Forty Fathoms® dimostratasi adeguata allo scopo, o anche altre purchè soddisfino i criteri di validità del saggio (vedi Capitolo 6) o siano utilizzabili con successo per l'allevamento del crostaceo (vedi Appendice alla Sezione 8050).
   Anche un'acqua di mare ipersalina, le cui caratteristiche sono descritte nel seguito, può essere utilizzata per allestire un test di tipo standard purchè sia stata ottenuta da un'area pelagica non contaminata e abbia dimostrato una variabilità trascurabile delle caratteristiche chimico fisiche. Si tenga presente che adottando quest'ultima soluzione l'effluente è saggiabile ad una concentrazione massima di circa il 65%, a meno di adottare ulteriori accorgimenti.
b) Se lo scopo del saggio è di valutare la tossicità cronica delle acque del recettore a seguito dell'immissione di uno scarico nelle stesse, sarà necessario usare come acqua di diluizione quella prelevata nell'area di sversamento ma in una zona non inquinata. L'acqua di diluizione dovrebbe essere prelevata immediatamente prima del saggio, o comunque, non oltre 96 ore dallo stesso. Se non usata entro 24 ore dal prelievo, l'acqua di diluizione verrà refrigerata (4°C). Oltre al gruppo di controllo, in cui gli organismi sono esposti all'acqua non contaminata prelevata dall'area recettrice, può essere utile disporre anche di un secondo gruppo di controllo in cui i crostacei sono esposti al mezzo normalmente utilizzato per l'allevamento di laboratorio. Tale soluzione rende disponibili più dati di riferimento a tutto vantaggio della interpretazione dei risultati.
   Se l'area recettrice è contaminata o sospettata di esserlo, si può ricorrere ad acque naturali o semisintetiche aventi caratteristiche fisiche e chimiche il più possibile simili a quelle dell'acqua recettrice.
c) Se, infine, l'obiettivo del saggio è di esaminare le interazioni tra i contaminanti dello scarico e quelli già presenti nell'acqua recettrice, quest'ultima sarà utilizzata come acqua di diluizione, indipendentemente dal suo grado di contaminazione, purchè prelevata al di fuori dell'area influenzata dallo scarico in esame. In questo tipo di saggio si avranno maggiori garanzie di corretta interpretazione dei risultati se si allestiscono due, ma preferibilmente tre gruppi di controllo. Nel primo i giovani individui di *M. bahia* sono esposti a quella stessa acqua dell'area di recezione che è utilizzata per diluire il campione di scarico; nel secondo gli organismi vengono esposti all'acqua non contaminata della zona recettrice, e nel terzo, infine, si utilizza il mezzo comunemente usato per l'allevamento di laboratorio. In questo modo dovrebbe essere possibile discriminare tra i possibili effetti nutrizionali e tossici che possono concorrere al risultato finale.

Generalmente un'acqua di scarico ha salinità trascurabile. Gli organismi devono tuttavia essere esposti alle varie diluizioni del campione da saggiare senza che le differenze di salinità delle soluzioni possano rappresentare una fonte di stress aggiuntivo a quello dei tossici o più semplicemente una fonte di variabilità dei risultati. Si tratta pertanto di uniformare la salinità delle diverse diluizioni di acqua di scarico. A questo scopo, si dispone di due soluzioni: la prima prevede l'impiego di acqua di mare ipersalina (100‰) come acqua di diluizione, mentre la seconda consiste nell'aggiunta di quegli stessi sali usati per la preparazione dell'acqua di mare artificiale.
Il principale vantaggio della prima soluzione è che l'acqua ipersalina può essere ottenuta, per evaporazione, da acqua di mare naturale di elevata qualità. Come tale essa contiene tutti i micronutrienti e colloidi biogenici richiesti per l'accrescimento e l'attività riproduttiva degli organismi marini, e può essere conservata, al buio e a temperatura ambiente, per periodi prolungati senza apparente degradazione. Il limite della prima soluzione risiede nel fatto che un effluente può essere saggiato ad una concentrazione massima non superiore all'80% se la salinità prescelta è del 20‰, od anche del 70% se la salinità voluta è del 30‰ (vedi Tab. 1). La seconda soluzione non presenta questo limite ma l'aggiunta di sali può, dal canto suo, modificare il pH dell'effluente o dell'eventuale acqua che richiede aggiustamenti, potendo alterare in tal modo anche la tossicità del campione. In generale, si tenga presente che valori di pH al di fuori dell'intervallo 7,5-8,5 sono da considerare come potenziale causa di danno per gli organismi. Se necessario il pH può essere riportato al valore desiderato con aggiunte di HCl o NaOH. Dopo l'aggiunta dei sali la soluzione viene mantenuta in agitazione moderata per circa 60 min con l'aiuto di un agitatore magnetico, e ciò per garantire che tutti i sali siano entrati in soluzione prima di introdurre gli organismi. È consigliabile includere nella serie dei trattamenti anche un controllo con acqua preparata in modo analogo per aggiunta di sali, al fine di verificare che tale procedura non causi effetti negativi.
Se fosse necessario saggiare l'effluente di scarico anche alla concentrazione del 100%, tra le due soluzioni descritte, solo l'aggiunta diretta di sali al campione "tal quale" può soddisfare questa esigenza procedurale.

Tabella 1: Esempio di calcolo dei volumi necessari all'allestimento di un saggio con un generico effluente di scarico avente salinità trascurabile. L'esempio ipotizza sei concentrazioni da saggiare in otto repliche da 150 mL ciascuna, una salinità di 20‰ e l'uso di acqua ipersalina (100‰) e ultrapura per le diluizioni del campione

Concentrazione effluente (%; v/v)	Acqua ultrapura (mL)	Effluente (mL)	Ipersalina (mL)
80	-	960	240
40	480	480	240
20	720	240	240
10	840	120	240
5	900	60	240
2,5	930	30	240

Le altre diluizioni componenti la serie del saggio verranno preparate diluendo il campione di effluente, che è stato portato alla salinità voluta, con acqua di mare alla stessa salinità. Quest'ultima, a sua volta, sarà ottenuta per diluizione di acqua ipersalina o per aggiunta di sali ad acqua ultrapura. Si può menzionare infine, la possibilità di preparare acqua ipersalina con i sali per acqua di mare artificiale. Come generalmente previsto per la preparazione di acqua di mare sintetica, anche in questo caso è preferibile che la preparazione del mezzo ipersalino preceda di alcuni giorni il suo uso. Si tenga presente che questa alternativa necessita di validazione.

3.4 Illuminazione

Il saggio viene condotto conservando le stesse condizioni di illuminazione alle quali sono allevati gli organismi. Il sistema di lampade fluorescenti ad ampio spettro, deve fornire a livel-

lo dell'area di sperimentazione un'intensità luminosa compresa tra 500 e 1000 lux con un fotoperiodo di 16 ore di luce e 8 ore di buio.

3.5 Temperatura

La temperatura a cui devono essere mantenute le soluzioni sottoposte a saggio è fissata in 26-27°C. Questa condizione è raggiunta immergendo i beaker del saggio in un bagno termostatato od operando all'interno di un ambiente interamente condizionato alla temperatura voluta.

3.6 Alimentazione

I giovani di *M. bahia* sono alimentati con naupli di *A.salina* schiusi preferibilmente da alcune ore e comunque da non più di 24 ore. I naupli sono somministrati sia durante il periodo di accrescimento che precede il saggio (vedi Paragrafo 3.2) che durante il saggio stesso. Nel corso della prova l'alimentazione è quotidiana e può essere quantificata in 150 naupli per ogni misidaceo. Se la somministrazione dell'intera quantità di cibo causasse un deficit significativo della concentrazione di O_2 disciolto, essa può essere ripartita in due tempi (75 naupli/misidaceo) adeguatamente distanziati nell'arco della giornata. La procedura per ottenere la dieta a base di *A. salina* è descritta in Appendice alla Sezione 8050.

3.7 Ossigeno disciolto

In presenza di valori elevati di BOD e alle concentrazioni più elevate di acqua di scarico, è maggiore il rischio che l'ossigeno disciolto scenda a livelli critici, non compatibili con la sopravvivenza degli organismi. Si raccomanda pertanto di controllare questo parametro e con maggior frequenza durante le prime ore di sperimentazione. Se la concentrazione di O_2 disciolto scende al di sotto del 60% del valore di saturazione (Tab. 2) si rende necessario aerare le soluzioni di effluente, facendo gorgogliare aria nei beaker di saggio mediante cannule in vetro o pipette Pasteur. Nel caso si debba procedere all'aerazione di una diluizione del campione, tutte le restanti devono essere aerate in modo analogo, includendo anche i recipienti di controllo. Il flusso d'aria deve essere mantenuto ad un livello minimo che non arrechi disturbo agli organismi. Usando delle cannule di vetro o delle pipette Pasteur, si può considerare che un flusso pari, indicativamente, a 100 bolle/minuto possa soddisfare tali requisiti.

4. Procedura di saggio con diluizione (effluente)

4.1 Saggio preliminare

Nel caso di campioni a tossicità sconosciuta o sospettati di essere particolarmente tossici, può essere vantaggioso effettuare una prova preliminare per meglio definire l'intervallo di tossicità entro cui condurre, successivamente, il saggio definitivo. Tuttavia, fatta eccezione per quegli scarichi la cui tossicità è imputabile a sostanze di confermata persistenza, è di solito molto importante allestire il saggio cronico nel più breve tempo possibile dal prelievo del campione. Pertanto un saggio preliminare a breve termine (24 ore) può generalmente rappresentare il solo utile compromesso tra il rispetto dei limiti di conservabilità e la disponibilità di indicazioni sul grado di tossicità del campione stesso. Un saggio preliminare di questo tipo è allestito seguendo la procedura descritta al quale si rinvia. Al contrario, se si sospetta che la tossicità dello scarico non sia affatto persistente, si rende necessario l'allestimento immediato del saggio cronico, seguendo le indicazione fornite nel seguito (vedi Paragrafo 4.2).
Se nell'eventuale prova preliminare si osservano effetti tossici acuti nella Sezione 8050, si può suggerire di adottare la minima concentrazione di campione che ha causato tale tipo di effetti come la massima di quelle che saranno poi saggiate nella prova definitiva a 7 giorni.

4.2 *Saggio definitivo*

Per la conduzione della prova definitiva si allestiscono 5 diluizioni del campione da esaminare. La sequenza 100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25% (v/v), caratterizzata da un fattore di diluizione 0,5, è applicabile a gran parte delle situazioni. Basandosi sulle informazioni eventualmente ottenute da un saggio preliminare, si potrà adottare un diverso intervallo di sperimentazione, un diverso fattore di diluizione o anche un maggior numero di concentrazioni. In generale, è comunque utile che gli organismi esposti alle concentrazioni più elevate vengano osservati più frequentemente nelle prime ore dopo l'avvio del saggio. Se si osservasse mortalità diventerebbe, infatti, possibile allestire nuove diluizioni di campione aggiungendole all'estremità inferiore dell'intervallo di tossicità che sarebbe così ampliato e migliorato nel suo potenziale informativo. Nel corso del saggio, le osservazioni relative alle diluizioni aggiunte andranno corrispondentemente ritardate rispetto ai tempi di allestimento originali.

Tabella 2: Valori di solubilità (mg/L) dell'ossigeno in acqua a diverse temperature e salinità ed alla pressione di 760 mm Hg (Richards and Corwin, 1956)

Temperatura	Salinità (‰)									
	0	5	10	15	20	25	30	35	40	43
0	14,2	13,8	13,4	12,9	12,5	12,1	11,7	11,2	10,8	10,6
1	13,8	13,4	13,0	12,6	12,2	11,8	11,4	11,0	10,6	10,3
2	13,4	13,0	12,6	12,2	11,9	11,5	11,1	10,7	10,3	10,0
3	13,1	12,7	12,3	11,9	11,6	11,2	10,8	10,4	10,0	9,8
4	12,7	12,3	12,0	11,6	11,3	10,9	10,5	10,1	9,8	9,5
5	12,4	12,0	11,7	11,3	11,0	10,6	10,2	9,8	9,5	9,3
6	12,1	11,7	11,4	11,0	10,7	10,3	10,0	9,6	9,3	9,1
8	11,5	11,2	10,8	10,5	10,2	9,8	9,5	9,2	8,9	8,7
10	10,9	10,7	10,3	10,0	9,7	9,4	9,1	8,8	8,5	8,3
12	10,5	10,2	9,9	9,6	9,3	9,0	8,7	8,4	8,1	7,9
14	10,0	9,7	9,5	9,2	8,9	8,6	8,3	8,1	7,8	7,6
16	9,6	9,3	9,1	8,8	8,5	8,3	8,0	7,7	7,5	7,3
18	9,2	9,0	8,7	8,5	8,2	8,0	7,7	7,5	7,2	7,1
20	8,9	8,6	8,4	8,1	7,9	7,7	7,4	7,2	6,9	6,8
22	8,6	8,4	8,1	7,9	7,6	7,4	7,2	6,9	6,7	6,6
24	8,3	8,1	7,8	7,6	7,4	7,2	6,9	6,7	6,5	6,4
26	8,1	7,8	7,6	7,4	7,2	7,0	6,7	6,5	6,3	6,1
28	7,8	7,6	7,4	7,2	7,0	6,8	6,5	6,3	6,1	6,0
30	7,6	7,4	7,1	6,9	6,7	6,5	6,3	6,1	5,9	5,8
32	7,3	7,1	6,9	6,7	6,5	6,3	6,1	5,9	5,7	5,6

Se è stato necessario refrigerare i campioni di scarico o di acqua di diluizione, i volumi necessari alla conduzione del saggio vengono prelevati dai contenitori, previo accurato mescolamento, e portati alla temperatura di 26-27°C. Preparate le diluizioni previste con le eventuali correzioni di salinità, si misura la concentrazione di ossigeno disciolto e se questa risultasse prossima o inferiore al limite di 4 mg/L si procede ad aerare i contenitori (vedi Paragrafo 3.7). Quando le soluzioni hanno raggiunto le condizioni indicate si introducono i giovani di *M. bahia*.

Ogni diluizione del campione viene distribuita in 8 repliche da 150 mL ciascuna. Per ogni replica si utilizzano 5 organismi di 7 giorni di età. Gli organismi vengono distribuiti secondo una sequenza casuale nei diversi contenitori sino al completamento del numero richiesto. Per evitare diluizioni significative delle soluzioni del saggio, è opportuno minimizzare il volume d'acqua trasferito con gli organismi. Questi sono trasferibili più facilmente se la pipetta (4 mm d.i.) provvista di bulbo elastico, è mantenuta in posizione verticale sopra l'organismo da prelevare, piuttosto che frontalmente o posteriormente allo stesso. Durante le operazioni di trasferimento, la reotassia del crostaceo fa sì che esso tenda ad aderire alle pareti del contenitore o alla superficie interna della pipetta. Attenzione, quindi, al rischio di perdite accidentali di individui.

È necessario limitare l'evaporazione delle soluzioni di saggio per non causare variazioni della salinità e della concentrazione degli inquinanti. Per controllare il fenomeno si possono usare dei fogli di polietilene trasparenti o altri dispositivi (vetro d'orologio), con i quali coprire i recipienti di saggio.
Quotidianamente si ispezionano gli organismi e si provvede al rinnovo delle soluzioni di campione ed alla somministrazione di cibo fresco. Prima del rinnovo e con l'aiuto di una pipetta con bulbo in lattice, vengono rimossi gli organismi deceduti e i naupli di artemia non consumati. Sono registrati come deceduti quegli organismi che non reagiscono ad una leggera stimolazione.
Durante le operazioni di ricambio, i gruppi di misidacei non vengono rimossi dai contenitori di saggio. Le soluzioni a cui essi sono stati esposti, sono versate lentamente in un contenitore avente lo scopo di permettere il recupero degli individui eventualmente fuoriusciti nel travaso, oltre alle misure di O_2 disciolto, pH e altri parametri. Raggiunto un volume residuo minimo di circa una decina di mL si procede a reimmettere lentamente nel contenitore di saggio 150 mL di soluzione fresca. Per preparare le soluzioni fresche si opera secondo le condizioni precisate a proposito dell'allestimento della prova.
Le acque di scarico o dell'area recettrice possono essere campionate con diverse modalità e frequenze la cui scelta è dettata dagli obiettivi della sperimentazione. L'argomento è trattato da altre pubblicazioni, mentre in questo documento è utile evidenziare che la conduzione del saggio può essere in parte coordinata con le modalità del campionamento. In pratica sono possibili tre diverse soluzioni:

a) un solo campione è usato per la conduzione di tutto il saggio, per cui gli organismi sono esposti, quotidianamente, a soluzioni fresche preparate con aliquote del medesimo campione che è conservato al buio e a 4°C;
b) il saggio è condotto utilizzando tre campioni prelevati secondo la sequenza d'uso; il primo campione è usato per l'allestimento e per i primi due rinnovi delle soluzioni di saggio (1° e 2° giorno), il secondo campione serve per il 3° e 4° giorno ed il terzo per il 5° e 6° giorno della sperimentazione. I tre campioni sono conservati al buio e a 4°C;
c) il saggio è condotto utilizzando 7 diversi campioni, prelevati secondo la sequenza di impiego, per cui i misidacei vengono esposti a delle soluzioni di saggio che sono allestite, come al solito, quotidianamente, ma ogni volta con un nuovo campione.

Al termine dei sette giorni di sperimentazione tutti gli organismi sopravvissuti vengono esaminati per determinarne il sesso e il grado di maturazione delle gonadi. Questo esame deve essere effettuato entro un massimo di 12 ore dal termine del saggio e se si prevede di operare al limite di questo arco di tempo è necessario sostituire le soluzioni di campione con la sola acqua di diluizione, lasciando comunque gli organismi nei propri contenitori. In questo modo si mantengono in vita i misidacei per il tempo necessario al completamento delle osservazioni e si evita che essi rimangano esposti ai tossici anche dopo il termine della sperimentazione.
Mediante l'esame dei singoli individui effettuato con un microscopio da dissezione, per ogni trattamento vengono registrati il numero degli organismi sessualmente immaturi, quello dei maschi e delle femmine, e per queste ultime, il numero di quelle aventi uova negli ovidotti o nel sacco di incubazione (Fig. 2-3). Queste osservazioni sono possibili solo negli individui vivi, poichè dopo la morte il corpo si opacizza rapidamente assumendo un colorazione biancastra.
Completato l'esame microscopico ogni organismo viene trasferito ad un retino, sciacquato ripetutamente con acqua deionizzata o Milli-Q e quindi deposto in una navicella d'alluminio, o anche su un foglietto dello stesso materiale (2-3 cm^2), di cui sia stato registrato il peso. Si ripete l'operazione per tutti gli organismi di ogni contenitore e si pone la navicella con i 5 crostacei in stufa a 60°C per 24 ore. Si trasferisce la navicella in un essicatore e dopo 1 ora si procede alla pesatura con bilancia analitica.
Con questa procedura e in assenza di mortalità, si ottengono, per ciascun trattamento, otto valori medi di peso secco e dunque altrettante valutazioni di accrescimento dei misidacei.

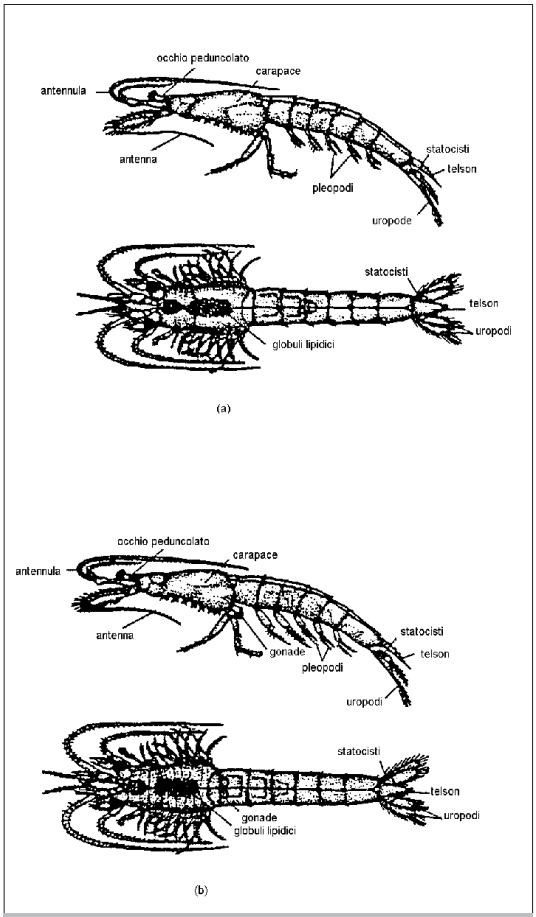


Figura 2: Misidaceo immaturo (a) e maschio adulto di M bahia (b).

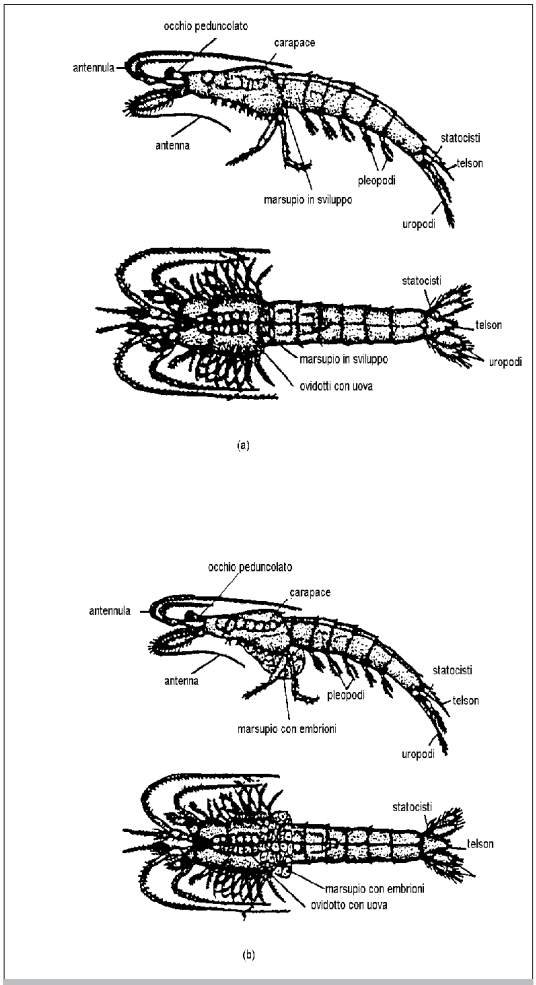


Figura 3: Femmina adulta di M. bahia con uova in sviluppo negli ovidotti (a) e con uova negli ovidotti ed embrioni nella sacca a marsupio (b).

5. Procedura di saggio senza diluizione (corpo idrico)

5.1 Saggio definitivo

La soluzione che viene comunemente adottata per individuare la presenza di effetti tossici di tipo cronico nelle acque del corpo idrico, consiste nell'esporre degli individui di *M. bahia* ad un campione non diluito delle sue acque.
Se l'acqua di allevamento ha salinità diversa da quella del campione da saggiare, si procede ad acclimatare i crostacei secondo le indicazioni date al Paragrafo (3.2). L'acqua usata per completare l'acclimatazione degli organismi, sia che si tratti di acqua naturale che di acqua sintetica, è utilizzata anche per l'allestimento del controllo.
A differenza del saggio su effluenti, il campione di acqua del corpo idrico è saggiato in un'unica serie di otto repliche. Questa viene affiancata, a seconda delle finalità del saggio, da una o più serie di organismi di controllo (vedi Paragrafo 3.3). In ogni replica, avente il volume di 150 mL, vengono trasferiti 5 giovani individui di *M. bahia* di 7 giorni di età. Tutti gli altri aspetti procedurali quali l'aerazione, il rinnovo delle soluzioni o l'alimentazione, sono da considerare invariati rispetto al saggio con diluizione e si rimanda, pertanto, ai paragrafi precedenti. Analogamente, al termine dei 7 giorni di esposizione si procede all'esame microscopico dei singoli individui ed alla determinazione del loro peso secco (vedi Paragrafo 4.2).

6. Validità del saggio

I risultati del saggio sono considerati accettabili se la concentrazione di ossigeno disciolto non è mai scesa al di sotto dei 4 mg/L in nessuno dei trattamenti; se al termine dei 7 giorni di sperimentazione la sopravvivenza degli organismi di controllo è ≥80% e se il loro peso secco medio è ≥0,20 mg/misidaceo.
Oltre alla sopravvivenza e all'accrescimento degli organismi anche la fecondità può essere utilizzata per valutare la tossicità del campione. Ciò è possibile se, al termine del saggio, la produzione di uova è osservabile in almeno il 50% delle femmine di controllo.

BIBLIOGRAFIA

VIGANÒ L. (1996): "Metodo per la valutazione della tossicità acuta con *Mysidopsis bahia*", *Notiziario dei Metodi Analitici IRSA*, giugno1996, 19-31.

8100. Metodo di valutazione della tossicità cronica (7 giorni) con *Ceriodaphnia dubia*

81. Introduzione

Il metodo descrive la procedura con cui è possibile indagare se un effluente di scarico o un'acqua superficiale contiene inquinanti a concentrazioni tali da causare effetti tossici di tipo cronico sul crostaceo *Ceriodaphnia dubia*. La mancata osservazione di effetti tossici di tipo cronico per un dato campione non esclude che essi siano osservabili saggiando campioni prelevati in altri momenti, e ciò in dipendenza della variabilità dello scarico o del corpo idrico superficiale e delle fonti di contaminazione che in essi trovano recapito.

2. Generalità sul metodo

In questo tipo di saggio giovani individui di *C. dubia* sono esposti per 7 giorni a campioni acquosi dei quali si voglia stimare la tossicità cronica. Generalmente, un campione di acqua di scarico, o più raramente di un corpo idrico superficiale, vengono saggiati ad almeno 5 diluizioni a ciascuna delle quali è esposto un numero definito di organismi neonati. Nell'arco di tempo di 7 giorni ed alle condizioni sperimentali descritte in questa metodica, i neonati di *C. dubia* raggiungono la maturità sessuale e sono in grado di produrre, a loro volta, tre schiuse di nuovi individui.
Solitamente un campione capace di effetti cronici manifesta la propria tossicità inibendo l'attività riproduttiva del cladocero; tuttavia, anche l'accrescimento è facilmente alterabile dalle sostanze tossiche presenti nel campione e, pertanto, la valutazione della tossicità dovrà basarsi, ovunque possibile, sull'esame di questi due parametri. I dati relativi all'accrescimento sono ottenibili, a saggio ultimato, mediante misurazioni di peso secco o più semplicemente di lunghezza corporea. Il confronto tra la riproduzione e la crescita degli organismi esposti alle diverse diluizioni del campione e quelle di un gruppo mantenuto come controllo, permetterà di individuare il valore di diluizione che non inibisce significativamente i parametri considerati (NOEC = "No Observed Effect Concentration"; massima concentrazione/diluizione alla quale non si osservano effetti statisticamente significativi). La tossicità cronica del campione si può manifestare anche sulla sopravvivenza del crostaceo. Elaborando gli eventuali dati di mortalità può essere possibile stimare la diluizione letale per una determinata percentuale di individui (es. LC_{50}), a diversi tempi di esposizione, sino a un massimo di 7 giorni.

3. Conduzione del saggio

3.1 Materiali e strumentazione

Per la conduzione del saggio di tossicità è necessario:

- almeno 120 contenitori del tipo beaker in vetro borosilicato con volume utile di 30 mL. Diversi laboratori utilizzano con successo dei contenitori "a perdere" in polistirene reperiti originalmente tra gli articoli commercializzati per uso alimentare. Minimizzare l'adsorbimento dei probabili tossici è un obiettivo importante nella scelta dei contenitori;
- sistema di lampade fluorescenti ad ampio spettro con un temporizzatore per il controllo del fotoperiodo e possibilmente un dispositivo che simuli la transizione graduale tra le fasi di luce e di buio;

- dispositivo per il controllo della temperatura delle soluzioni da saggiare nell'ambito di 25±1°C per tutta la durata della sperimentazione;
- analizzatore di ossigeno disciolto con sensore di dimensioni adeguate alla misura nei contenitori di saggio;
- microscopio binoculare da dissezione, provvisto di illuminazione laterale;
- micrometro oculare e micrometro obbiettivo;
  fonte di aria compressa a bassa pressione, con cannule in vetro o pipette Pasteur per far gorgogliare aria nelle soluzioni da aerare. L'uso di un piccolo compressore del tipo usato in acquariologia, può costituire una soluzione adeguata. L'aria distribuita dagli impianti centralizzati è spesso contaminata da vapori di oli o altri inquinanti che è necessario rimuovere con opportuni dispositivi di filtrazione.

3.2 Organismi per il saggio

La specie utilizzata in questo saggio di tossicità è il crostaceo cladocero *Ceriodaphnia dubia* che è allevato in laboratorio seguendo le indicazioni fornite nell'Appendice A2 del metodo 8040 per la valutazione della tossicità acuta con *C. dubia*. Il saggio è allestito con i neonati appartenenti alla terza schiusa o ad una delle successive, prodotte da femmine mantenute in condizioni di allevamento controllate e rispondenti ai requisiti di buone condizioni colturali descritti in Appendice al citato metodo per saggio acuto. In generale, è necessario che i neonati destinati alla prova siano prodotti da femmine allevate per almeno 7 giorni nella stessa acqua usata per le diluizioni o in un'acqua con caratteristiche similari (vedi Paragrafo 3.3).
La prova deve essere allestita con giovani individui nati entro le 24 ore precedenti l'avvio del saggio. Inoltre, è preferibile che la differenza di età tra gli individui sia contenuta entro alcune ore a tutto vantaggio della contemporaneità degli eventi di schiusa osservabili nel corso della prova e della facilità di interpretazione dei risultati. Da un punto di vista pratico è facilmente applicabile la limitazione d'uso ad un arco di tempo massimo di 8-12 ore.
Se i neonati non vengono utilizzati entro 2-3 ore dall'isolamento dai recipienti in cui sono schiusi, è necessaria la somministrazione di cibo (vedi Paragrafo 3.6).

3.3 Acqua di diluizione

Come regola generale le diluizioni del campione da saggiare ed il controllo sono allestiti con la stessa acqua usata per l'allevamento di *C. dubia*. In dipendenza dalle finalità del saggio sono utilizzabili, tuttavia, altre acque di diluizione o di controllo e si rende quindi necessario distinguere tra diverse possibili soluzioni.

a) Se lo scopo è di evidenziare la capacità di un effluente o delle acque di un corpo idrico di produrre effetti tossici cronici, studiandone l'andamento nel tempo o confrontando il grado di contaminazione di diverse aree, come diluente e controllo si adotterà un'acqua semisintetica (saggio in condizioni standard) che abbia le seguenti caratteristiche: pH 7,5-8,5, durezza 140-160 mg $CaCO_3$/L, alcalinità 110-120 mg $CaCO_3$/L, Ca/Mg >1 e prossimo a 4, Na/K >1 e prossimo a 10, preparata a partire da un'acqua minerale scelta tra quelle disponibili in commercio. Pur con la medesima finalità, si possono distinguere due modi di impiego di un'acqua minerale. Nel primo caso, ci si serve di un'acqua con un elevato contenuto di sali e ad una certa aliquota di acqua minerale viene aggiunta acqua ultrapura o di qualità equivalente, in modo da ottenere, per diluizione, il mezzo semisintetico con le caratteristiche volute. Nel secondo caso, ci si serve di un'acqua con basso contenuto di sali (oligominerale), che viene corretta nei suoi costituenti maggiori mediante l'aggiunta di sali di grado analitico al fine di ottenere il mezzo con le caratteristiche indicate. Per ulteriori dettagli si rinvia all'Appendice A3 della Sezione 8040.
b) Se lo scopo del saggio è di valutare la tossicità cronica delle acque del recettore a seguito dell'immissione di uno scarico nelle stesse, come diluente e controllo si userà l'acqua non contaminata del recettore, prelevata a monte dell'immissione o comunque al di fuori dell'area esposta a fonti di contaminazione. Nel caso essa non sia disponibile, si può utiliz-

zare un'acqua prelevata da un altro corpo idrico superficiale o un'acqua semisintetica (cfr. "punto a") avente approssimativamente le stesse caratteristiche chimiche e, in particolare, la stessa durezza del corpo idrico recettore oggetto del controllo. In qualche caso è anche possibile operare modificando la composizione di un'acqua naturale, purché di qualità adeguata, previa aggiunta di sali (reagenti di grado analitico) e nelle quantità necessarie. Il prelievo di acque naturali deve essere effettuato immediatamente prima del loro impiego e comunque non oltre le 96 ore dallo stesso, mantenendo i campioni refrigerati (4°C) e al buio quando se ne faccia uso a più di 24 ore dalla raccolta. Oltre al controllo rappresentato dagli organismi esposti all'acqua non contaminata del recettore, dovrebbe essere allestito anche un secondo gruppo di controllo nel quale gli individui sono esposti all'acqua comunemente utilizzata per l'allevamento.

c) Se, infine, lo scopo del saggio è quello di esaminare le interazioni tra i contaminanti presenti nello scarico e quelli veicolati dal recettore, come acqua di diluizione si userà quella del recettore stesso, indipendentemente dal suo grado di contaminazione, prelevata a monte o comunque al di fuori dell'influenza dello scarico in esame. In questo caso per una corretta interpretazione dei risultati è necessario allestire tre tipi di controllo. Nel primo, gli organismi sono esposti alla stessa acqua del recettore che è usata per la diluizione dello scarico; nel secondo, sono esposti all'acqua del recettore prelevata in un'area non contaminata; nel terzo, infine, gli organismi sono mantenuti nell'acqua comunemente utilizzata per l'allevamento di laboratorio. In questo modo dovrebbe essere possibile discriminare tra i diversi contributi nutrizionali e tossicologici che spesso concorrono a determinare il risultato finale.

3.4 Illuminazione

Gli organismi esposti ai campioni da saggiare sono mantenuti nelle stesse condizioni di illuminazione in cui sono allevati. La sorgente luminosa è costituita da un sistema di lampade fluorescenti ad ampio spettro (Indice di resa cromatica ≥90), il fotoperiodo è di 16 ore di luce e 8 di buio e un'intensità luminosa al piano di lavoro compresa tra 500 e 1000 lux si è generalmente dimostrata adeguata. Compatibilmente con il potere tampone dell'acqua di saggio e con la densità di alghe presenti, può essere preferibile mantenere valori di intensità luminosa prossimi al limite inferiore dell'intervallo consigliato. Elevate intensità luminose possono indurre, infatti, un'attività fotosintetica tale da aumentare il pH del mezzo sino a valori che potrebbero rivelarsi dannosi o anche letali per il crostaceo. Più in generale si tenga presente che quando il pH approssima i valori di 6,5 e 9,0 è da considerare come possibile causa di danno.

3.5 Temperatura

Le soluzioni da saggiare e gli organismi in esse esposti sono mantenuti per tutta la durata della sperimentazione a 25±1°C. Questo ambito di temperatura è facilmente mantenibile immergendo i contenitori del saggio in un bagno termostatato o condizionando la temperatura dell'intero ambiente in cui è condotto il lavoro sperimentale.

3.6 Alimentazione

I giovani individui di *C. dubia* vengono nutriti sin dall'allestimento del saggio e in seguito quotidianamente per tutta la sua durata. Se i neonati non vengono utilizzati entro 2-3 ore dall'isolamento dai contenitori in cui sono schiusi, si consiglia di non lasciarli a digiuno fino al momento del trasferimento alle soluzioni test ma di provvedere alla somministrazione della stessa dieta adottata per la conduzione dei saggi e nei medesimi quantitativi.
Sono disponibili due tipi di diete che si differenziano solo per gli ingredienti somministrati come integratori mentre condividono lo stesso componente di base rappresentato dall'alga verde unicellulare *Selenastrum capricornutum* (recentemente riclassificata come *Pseudokirchneriella subcapitata*). Nelle Appendici A4 e A5 della Sezione 8040 è descritta la preparazione delle due diete che sono indicate, rispettivamente, come composita e semplificata. In ogni ca-

so, per la conduzione del saggio deve essere usato lo stesso tipo di alimentazione che è adottato per l'allevamento degli organismi.
La dieta composita prevede che la sospensione concentrata di *S. capricornutum* sia somministrata in volumi tali da ottenere nelle soluzioni di saggio una densità di 200-250.000 cell/mL. L'alimento integratore, che per la dieta composita è indicato con la sigla YTC, è preparato in sospensioni contenenti 1,8 g/L di solidi ed è dosato in volumi pari a 100 µL per 15 mL di soluzione di saggio.
La seconda dieta, quella indicata come semplificata, prescrive una densità di cellule algali di 300.000 cell/mL mentre l'integrazione è data da una sospensione di lievito (*Saccharomyces cerevisiae*), anch'esso somministrato in ragione di 300.000 cell/mL, e da una soluzione di tre vitamine. Quest'ultima è composta da tiamina cloridrato (B_1 75 µg/L, biotina (H) 0,75 µg/L e cianocobalamina (B_{12}) 1 µg/L ed è somministrata nella quantità di 1 mL per litro di soluzione di saggio.
Quotidianamente gli organismi sono trasferiti nelle rinnovate soluzioni di saggio che dovranno contenere le quantità indicate della dieta prescelta.

3.7 Ossigeno disciolto

Alla temperatura di conduzione del saggio si misura la concentrazione di ossigeno disciolto nelle soluzioni di campione più concentrate e nel mezzo di controllo destinati alla prova. Se la concentrazione risultasse prossima o inferiore al 40% del valore di saturazione, prima dell'allestimento del saggio si deve provvedere ad aerare le soluzioni con un moderato gorgogliamento di aria. Più raramente può verificarsi anche il problema opposto e cioè di sovrasaturazione. Anche in questi casi un'aerazione moderata dovrebbe ricondurre la concentrazione di ossigeno disciolto entro l'intervallo 40-100% del valore di saturazione.
Se durante il saggio si osserva che il consumo di ossigeno è tale da rischiare di invalidare la prova, si può intervenire con rinnovi più frequenti delle soluzioni, ricorrendo a nuove aliquote di campione preventivamente aerato.

4. Procedura di saggio con diluizione (effluente)

4.1 Saggio preliminare

Fatta eccezione per effluenti o acque superficiali la cui tossicità sia già stata saggiata in prove antecedenti, di solito mancano dei dati pregressi che sarebbero potenzialmente utili all'allestimento di un test a 7 giorni. Peraltro anche nei casi in cui tali informazioni siano disponibili, è osservazione comune che i campioni prelevati in momenti diversi possono dare effetti anche marcatamente diversi, in dipendenza della variabilità dello scarico o del recettore.
Un saggio preliminare acuto (24 ore) da condurre con *C. dubia* sullo stesso campione che deve essere saggiato nella prova a 7 giorni, può essere un utile compromesso tra la conservabilità del campione e la possibilità di avere indicazioni sul suo grado di tossicità. L'osservazione, ad esempio, di una elevata tossicità acuta può evitare l'inutile allestimento delle concentrazioni maggiori, quelle cioè che si dimostrerebbero incapaci di dare informazioni di tipo cronico, favorendo pertanto una scelta più efficace delle diluizioni da saggiare a 7 giorni. Questa possibilità vale ovviamente per tossicità che siano imputabili a contaminanti relativamente persistenti, viceversa si rende necessario l'allestimento immediato del saggio definitivo, con le precauzioni descritte nel seguito (vedi Paragrafo 4.2).
Per la conduzione di un saggio acuto preliminare la temperatura da adottare è 25±1°C, e cioè la stessa del saggio a 7 giorni, mentre la procedura è quella descritta nel metodo 8040 al quale si rinvia.

4.2 Saggio definitivo

La procedura comunemente adottata consiste nell'allestimento di almeno 5 diluizioni del campione che, in assenza di dati pregressi, sono individuate nella seguente serie: 100%, 50%, 25%,

12,5% e 6,25% (v/v). I valori sono in serie geometrica con un fattore di diluizione pari a 0,5. Se l'effluente è noto o sospettato di essere particolarmente tossico, la serie di concentrazioni deve essere opportunamente ampliata dal lato delle concentrazioni inferiori, non allestendo, eventualmente, quelle all'opposto più elevate, quali le concentrazioni 50 e 100%. Viceversa, se non si hanno informazioni preliminari, si può adottare un semplice accorgimento che consiste nel controllare frequentemente le concentrazioni più elevate per le prime ore dopo l'inizio del saggio: se si osserva mortalità si provvede ad allestire altre diluizioni, ampliando la serie prescelta nella direzione delle concentrazioni minori.
Se è stato necessario refrigerare i campioni, le aliquote destinate al saggio sono prelevate dopo accurato mescolamento e portate alla temperatura scelta per la prova. Si procede poi alla misurazione della concentrazione di O_2 disciolto in accordo alle indicazioni date in precedenza (vedi Paragrafo 3.7). Solo quando le 5 o più diluizioni hanno raggiunto le condizioni indicate per il test, vengono immessi gli organismi. Ogni individuo è mantenuto singolarmente in un beaker contenente almeno 15 mL di soluzione di saggio. Per ciascuna diluizione di campione vengono saggiati 10 individui, ognuno dei quali rappresenta pertanto una replica di quella diluizione. Procedura analoga vale anche per il gruppo di organismi di controllo.
Per il trasferimento si utilizza una pipetta di vetro, provvista di bulbo in lattice per l'aspirazione e con diametro interno di almeno un paio di mm, avendo cura di immettere gli organismi nel nuovo recipiente, solo quando l'estremità della pipetta è sotto la superficie del liquido. Per evitare una diluizione significativa delle soluzioni di saggio è necessario limitare al minimo il volume di acqua trasferito con gli animali. Si raccomanda la distribuzione casuale dei neonati nei recipienti contenenti le diverse concentrazioni come pure il posizionamento casuale dei recipienti nell'area di lavoro. A distribuzione completata ogni individuo risulterà identificato dal valore di concentrazione o comunque dal tipo di trattamento cui esso è esposto e da un numero progressivo compreso tra 1 e 10, tante sono le repliche che compongono ciascun gruppo sperimentale. Tale identificazione deve restare immutata sino al termine del saggio, permettendo così di documentare la vicenda espositiva di ogni singolo organismo (sopravvivenza, eventi riproduttivi, accrescimento ecc.).
Quotidianamente si provvede al rinnovo delle soluzioni del saggio. Pertanto, ogni 24 ore, gli individui di *C. dubia* vengono trasferiti ad una nuova serie di recipienti, contenenti soluzioni di saggio e cibo freschi, preparati secondo le stesse indicazioni seguite per l'allestimento della prova. In concomitanza con le operazioni di trasferimento, si registrano e rimuovono gli organismi deceduti, si contano e scartano i neonati prodotti e si misurano O_2 disciolto, pH o altri parametri.
In funzione del tipo di informazioni da ottenere, scarico o recettore sono campionati con diverse modalità e frequenze. Al tema specifico sono dedicati altri documenti, mentre nell'ambito di questo metodo è opportuno evidenziare che la conduzione del saggio a 7 giorni può essere coordinata con la frequenza e le finalità del campionamento. In pratica sono possibili tre diverse soluzioni:

a) un solo campione è usato per la conduzione di tutto il saggio, per cui gli organismi sono trasferiti, quotidianamente, in soluzioni fresche preparate con aliquote del medesimo campione che è conservato al buio e a 4°C;
b) il saggio è condotto utilizzando tre campioni prelevati secondo la sequenza d'uso; il primo campione è usato per l'allestimento e per i primi due rinnovi delle soluzioni di saggio (1° e 2° giorno), il secondo campione serve per il 3° e 4° giorno ed il terzo per il 5° e 6° giorno della sperimentazione. I tre campioni sono conservati per il periodo d'uso al buio e a 4°C;
c) il saggio è condotto utilizzando 7 campioni prelevati secondo la sequenza di impiego, per cui quotidianamente gli organismi sono trasferiti alla serie di soluzioni di saggio allestita, ogni giorno, con un nuovo campione.

Gli organismi del gruppo di controllo mantenuti nelle condizioni indicate in questo metodo danno luogo a 3 schiuse di nuovi individui nei 7 giorni di sperimentazione. La prima schiusa è prodotta entro il quarto giorno di saggio; la seconda può essere prodotta indifferentemente al quinto o al sesto, mentre la terza ed ultima schiusa, è osservabile al settimo giorno di saggio.

Completata quest'ultima si può procedere anche alla valutazione dell'accrescimento degli organismi mediante la misurazione del peso secco o, più semplicemente, della lunghezza corporea di ciascuno di essi. Quest'ultima è misurata dall'apice dell'elmetto alla base della spina posteriore del carapace, mediante un microscopio e un micrometro oculare. Il peso secco è misurato con una microbilancia dopo esposizione di 24 ore alla temperatura di 60°C.
Talvolta alcuni organismi di controllo non riescono a produrre la terza schiusa entro il termine dei 7 giorni di sperimentazione. In questi casi, è di solito sufficiente attendere alcune ore per osservare il rilascio delle schiuse mancanti e completare così la raccolta dei risultati. Osservazione analoga può valere anche per gli altri gruppi sperimentali, sebbene, in questo caso, sia necessaria maggiore cautela poichè uno dei possibili effetti dell'esposizione a sostanze tossiche può essere l'aborto degli embrioni con l'exuvia e quindi la mancata osservazione di una o più schiuse. La terza schiusa, apparentemente tardiva, potrebbe essere, pertanto, il prodotto di una quarta deposizione. Un errore in tal senso causerebbe una valutazione errata dell'attività riproduttiva e dell'accrescimento dell'organismo.
Il trasferimento quotidiano degli animali può interrompere inavvertitamente la nascita di un gruppo di neonati la cui schiusa verrebbe così conteggiata come due eventi riproduttivi osservati in giorni consecutivi. L'esame delle exuvie del genitore permette di risolvere facilmente l'equivoco e di assegnare i neonati ad un unico evento riproduttivo.
Viceversa, un organismo che non si riproduce affatto per tutta la durata del test si rivela generalmente un individuo di sesso maschile, più raramente una femmina sterile, ed i suoi risultati vengono esclusi dall'esame del gruppo di appartenenza. Prima di scartare il dato è opportuno procedere, tuttavia, ad un esame accurato del singolo individuo e delle sue exuvie, in quanto gli organismi esposti ad un campione tossico o a carenze nutrizionali possono abortire gli embrioni manifestando una sterilità che si rivelerebbe, in questo caso, solo apparente.

5. Procedura di saggio senza diluizione (corpo idrico)

5.1 Saggio definitivo

I rapporti di diluizione tra sorgente di contaminazione e recettore rendono talvolta inutile la pratica di diluire il campione del corpo idrico al fine di completare con successo un saggio di tipo cronico. Ne deriva che la soluzione adottata per indagare se un corpo idrico contiene tossici capaci di causare effetti cronici su *C. dubia* è spesso quella di condurre il saggio a 7 giorni su un campione non diluito delle sue acque.
Per questo tipo di saggio si allestisce una sola serie di dieci contenitori, corrispondente a concentrazione 100% (v/v), cui vengono esposti dieci neonati di ceriodafnia mantenuti singolarmente secondo la procedura del saggio con diluizione (vedi Capitolo 4). Tale serie sarà affiancata da uno o più serie di organismi di controllo a seconda delle finalità del saggio medesimo (vedi Paragrafo 3.3). Anche in questo tipo di prova valgono le considerazioni fatte per il saggio con diluizione.

6. Validità del saggio

Al termine dei 7 giorni di sperimentazione, i risultati del saggio sono giudicati accettabili se la concentrazione di ossigeno disciolto nei diversi trattamenti si è mantenuta ≥40% del valore di saturazione, se la sopravvivenza degli organismi di controllo è ≥80% e il numero cumulativo medio di neonati prodotti dagli individui del controllo nelle tre schiuse è ≥15.

BIBLIOGRAFIA

VIGANÒ L. (1996): "Metodo per la valutazione della tossicità acuta con *Ceriodaphnia dubia*", *Notiziario dei Metodi Analitici IRSA*, Giugno1996, 9-19.

8110. Metodo di valutazione della tossicità cronica (7 giorni) con *Cyprinodon variegatus*

1. Introduzione

Viene descritto un metodo standard il cui scopo è quello di stimare la tossicità cronica, più esattamente sub-cronica, di effluenti di scarico ed acque di mare sul pesce *Cyprinodon variegatus*. La mancata osservazione di effetti tossici di tipo cronico per un particolare campione non esclude che essi potranno essere osservati con campioni prelevati in momenti successivi, e ciò semplicemente a causa della possibile variabilità delle fonti di contaminazione, siano esse puntiformi o diffuse, come anche della capacità di diluizione dell'area recettrice alla quale esse recapitano.

2. Generalità sul metodo

La metodologia di saggio per la valutazione della tossicità cronica di un effluente di scarico o di un'acqua di mare per *Cyprinodon variegatus*, prevede che gli avannotti di questa specie ittica, schiusi da meno di 24 ore, siano esposti ad un campione delle acque da esaminare per un periodo di 7 giorni.
Gli effetti cronici di uno scarico vengono valutati mediante l'esposizione di almeno cinque gruppi di avannotti ad altrettante diluizioni dell'effluente. Al termine del periodo di esposizione la mortalità e l'accrescimento dei cinque gruppi sperimentali sono confrontati con le risposte di un ulteriore gruppo di avannotti mantenuti come controllo. Questo esame, condotto con metodi statistici, permette di individuare quella concentrazione di scarico che non riduce significativamente (NOEC) sia la sopravvivenza che l'accrescimento di *C. variegatus*. Le percentuali di organismi deceduti alle diverse diluizioni di campione possono essere ulteriormente elaborate per definire la concentrazione di scarico che si stima letale per una determinata percentuale dei giovani ciprinodontidi (es. LC_{50}). Compatibilmente con il tipo di risposte ottenute, è possibile calcolare questo valore di concentrazione letale per tempi di esposizione crescenti sino al termine massimo dei 7 giorni del saggio.
La ricerca in acqua di mare di inquinanti capaci di effetti tossici cronici si può avvalere dello stesso tipo di procedura descritta per un effluente. Tuttavia, a causa dei rapporti di diluizione, generalmente elevati, tra la fonte di contaminazione e l'acqua recettrice, è facile prevedere che l'allestimento di una serie di diluizioni riuscirebbe a ridurre la concentrazione degli inquinanti al di sotto del limite di rilevabilità del saggio stesso. Per questi motivi, la tossicità cronica delle acque di mare viene comunemente valutata con un saggio senza diluizione nel quale gli avannotti di *C. variegatus* sono esposti al campione "tal quale". Anche in questo caso la significatività di eventuali riduzioni di sopravvivenza o di accrescimento è determinata per confronto statistico con un gruppo di organismi di controllo.

3. Conduzione del saggio

3.1 Materiali e strumentazione

In aggiunta alla comune dotazione strumentale di laboratorio, la conduzione del saggio a 7 giorni richiede:

- almeno 18 contenitori per l'esposizione degli avannotti alle soluzioni di saggio.

Devono essere utilizzati dei recipienti con volume utile di 750 mL, in vetro borosilicato, del tipo beaker, cristallizzatori o anche vaschette come quella illustrata in Fig. 1. Il compartimento laterale di quest'ultima, che è separato dal principale mediante un retino, serve ad effettuare le operazioni di rinnovo delle soluzioni senza arrecare disturbo agli organismi del saggio;
- sistema di lampade fluorescenti ad ampio spettro, controllato da un temporizzatore per la simulazione del fotoperiodo e possibilmente da un dispositivo che consenta la transizione graduale tra le fasi di luce e di buio;
- bagno termostatato o altro dispositivo per il mantenimento della temperatura delle soluzioni da saggiare a 25±1°C e per l'intera durata del saggio;
- analizzatore di ossigeno disciolto;
- misuratore di salinità;
- fonte di aria compressa a bassa pressione con cannule in vetro o pipette Pasteur. Negli impianti centralizzati gli oli sono contaminanti comuni e devono essere rimossi con cartucce a carbone attivo. Gli aeratori usati in acquariologia costituiscono una soluzione adeguata;
- 2-4 imbuti separatori da 2 L per la schiusa delle cisti di Artemia salina;
- cisti di Artemia salina con le caratteristiche di idoneità descritte in Appendice alla Sezione 8070 per la valutazione della tossicità acuta con *C. variegatus*;
- miscela di sali per la preparazione di acqua di mare artificiale. Le miscele commerciali identificate dal marchio Forty Fathoms® e HW Marinemix® hanno dato buoni risultati sia per la coltura che per la conduzione dei saggi.

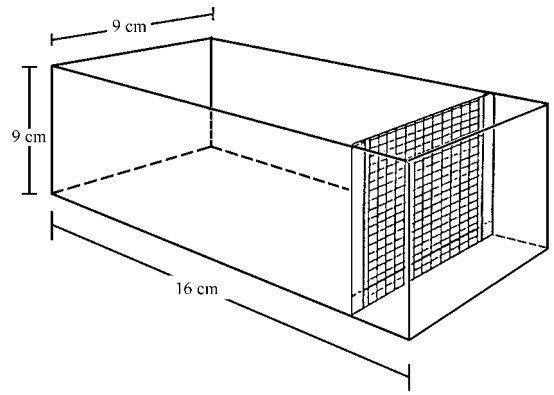


Figura 1: Vaschetta in vetro a due comparti separati da un retino in teflon o altro materiale idoneo. Il comparto più ampio è dedicato all'esposizione dei pesci, l'altro alle operazioni di rinnovo delle soluzioni di saggio (Norberg e Mount,1985).

3.2 Organismi per il saggio

Per la conduzione del saggio a 7 giorni, si utilizzano le larve di *C. variegatus* di età pari o inferiore a 24 ore (Fig. 2, stadio C). Le uova fecondate necessarie alla produzione degli avannotti possono essere acquistate da allevatori specializzati od ottenute in laboratorio da esemplari adulti mantenuti secondo la procedura descritta in Appendice alla Sezione 8070 per la valutazione della tossicità acuta con *C. variegatus*. In breve, 7-8 giorni prima dell'avvio del saggio si isolano i riproduttori nelle apposite vasche. Al fine di disporre del numero sufficiente di larve aventi l'età richiesta, è necessario raccogliere le uova deposte nell'arco di 2-3 giorni. Ciò è dovuto sia ad una consistenza variabile dei singoli eventi riproduttivi come al fatto che, anche in condizioni ideali, le uova appartenenti alla stessa deposizione schiudono distribuite in un arco di tempo che può raggiungere le 72 ore. Da ciò deriva che il mantenimento in incubazione di più gruppi di uova, che per quanto detto avranno tempi di schiusa sovrapposti, offre maggiori garanzie di disporre del numero di larve necessario al saggio.
A 25°C lo sviluppo dell'embrione si completa mediamente in 6-7 giorni. Per facilitare la cu-

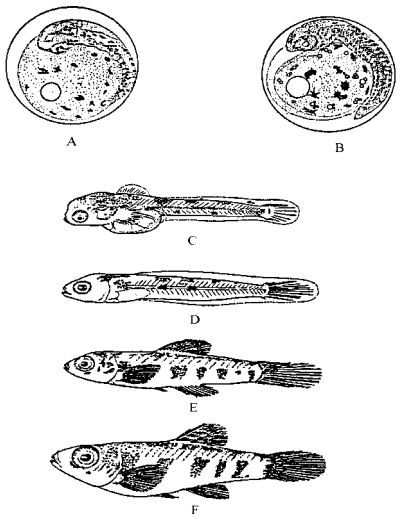


Figura 2: Sviluppo embrionale di C. variegatus. A: embrione 48 ore dopo la fecondazione, interamente segmentato e con pigmentazione sul sacco e sul corpo; B: embrione di 72 ore, libero di muoversi all'interno dell'uovo; C: larva appena schiusa, lunghezza 4 mm; D: giovane individuo di 5 giorni con sacco vitellino completamente assorbito; E e F: giovani esemplari rispettivamente di 9 e 12 mm (modificata da U.S. EPA, 1988).

ra e l'osservazione degli embrioni durante il periodo di incubazione, è necessario ripulire le uova dai filamenti di cui sono provviste e che le farebbero aderire le une alle altre. Per fare questo, almeno 4 ore dopo la deposizione, si fanno rotolare su di una reticella di nylon (250-500 μm), pressandole delicatamente con un dito. A 48-72 ore dalla fertilizzazione, l'embrione, osservato con un microscopio da dissezione, ha l'aspetto illustrato in Fig. 2 (stadi A e B). Le uova non fecondate, gli embrioni deformi o deceduti, vengono scartati durante il rinnovo quotidiano del mezzo di incubazione. Circa 24 ore prima della schiusa, la salinità del mezzo di incubazione viene adeguata, se necessario, a quella di conduzione del test.
La distribuzione degli eventi di schiusa in un arco di tempo di più giorni, fa sì che anche nelle 48 ore precedenti l'avvio del saggio una frazione degli embrioni in incubazione schiuda. È opportuno raccogliere e mantenere in un recipiente a parte anche questi organismi poichè potrebbero essere utilizzati, a loro volta, per il saggio.
È già stato precisato che il saggio deve essere allestito con gli avannotti nati entro le 24 ore antecedenti. Se, tuttavia, nonostante gli accorgimenti indicati, il numero degli organismi non fosse sufficiente, i pochi individui mancanti possono essere prelevati proprio tra quelli schiusi nelle 24 ore ancora precedenti (48 ore dal "test"). Questi ultimi verranno aggiunti, nel numero necessario, agli organismi del gruppo principale e in tal modo saranno distribuiti casualmente tra i diversi trattamenti.

3.3 Acqua di diluizione

Come condizione generale, le diluizioni del campione da saggiare ed il controllo sono preparati con lo stesso tipo di acqua che è stata usata per l'allevamento o l'incubazione di *C. variegatus*. In relazione alle finalità del test, è comunque possibile utilizzare altre acque di diluizione o di controllo, pertanto è opportuno caratterizzare almeno tre tipi di condizioni sperimentali:

a) Se l'obiettivo è di stimare la tossicità cronica di un effluente o di un'acqua di mare naturale, producendo un dato assoluto atto a confronti nel tempo o tra diverse aree, verrà utilizzata un'acqua di diluizione artificiale standard. Per la preparazione di acqua di mare standard si ricorre a miscele di sali già pronte e disponibili in commercio, quali Forty Fathoms® e HW Marinemix®. La salinità prevista per un saggio in condizioni standard è pari a 35‰. Anche

un'acqua di mare ipersalina, le cui caratteristiche sono descritte nel seguito, è utilizzabile per condurre il saggio a 7 giorni, purchè sia stata ottenuta da acqua di mare prelevata in area pelagica non contaminata e con variabilità trascurabile delle caratteristiche chimico fisiche. Se per effettuare il test di un effluente di scarico viene usata un'acqua ipersalina, si tenga presente che la massima concentrazione che può essere saggiata è pari a 65% (v/v), a meno di adottare ulteriori accorgimenti.

b) Nel caso la finalità del saggio sia quella di stimare la tossicità cronica di uno scarico nelle acque recettrici non contaminate, sarà necessario usare come acqua di diluizione e controllo quella prelevata nell'area di sversamento ma al di fuori dell'influenza di eventuali fonti di contaminazione. L'acqua di diluizione dovrebbe essere prelevata immediatamente prima del saggio e non oltre le 96 ore dallo stesso. Se non usata entro le 24 ore dal prelievo, l'acqua di diluizione verrà refrigerata (4°C). Se l'area recettrice è contaminata o sospettata di esserlo, si può ricorrere ad acque naturali o sintetiche aventi caratteristiche fisiche e chimiche il più possibile simili a quelle dell'acqua recettrice. Se si usano acque di diluizione sospettate di modificare, in qualche misura, l'accrescimento o la sopravvivenza di *C. variegatus*, è preferibile includere un secondo controllo preparato ad esempio con l'acqua di allevamento, un'acqua cioè i cui effetti sull'organismo siano ben documentati.

c) Se, infine, l'obiettivo del saggio è di esaminare le interazioni tra i contaminanti dello scarico e quelli già presenti nell'acqua di mare recettrice, quest'ultima sarà utilizzata come acqua di diluizione, indipendentemente dal suo grado di contaminazione, purchè prelevata al di fuori dell'area influenzata dallo scarico in esame. La conduzione di questo tipo di saggio richiede l'allestimento di due gruppi di controllo. Un primo gruppo in cui gli organismi sono esposti a quella stessa acqua di diluizione che ha, verosimilmente, un certo grado di contaminazione, ed un secondo gruppo in cui gli organismi sono esposti all'acqua non contaminata dell'area di ricezione. Anche in questo tipo di saggio, come in quello descritto al punto precedente, potrebbe essere vantaggioso disporre di un ulteriore gruppo di riferimento allestito con acqua di allevamento o incubazione.

Un effluente di scarico ha, comunemente, una salinità trascurabile. Gli organismi devono, tuttavia, essere esposti alle diluizioni di campione senza che le differenze di salinità possano rappresentare una fonte di stress o di variabilità dei risultati. È dunque necessario uniformare la salinità delle diverse diluizioni di campione e a questo scopo, vi sono due possibili soluzioni: la prima prevede l'impiego di acqua di mare ipersalina (100‰) come acqua di diluizione, mentre la seconda consiste nell'aggiungere i sali commercializzati per la preparazione di acqua di mare artificiale.
Il principale vantaggio della prima soluzione è che l'acqua ipersalina può essere ottenuta, previa filtrazione (≤1mm) e per evaporazione controllata (<40°C), da una qualsiasi acqua di mare naturale purchè di elevata qualità, e a questo proposito si consiglia il prelievo da aree pelagiche. L'acqua ipersalina contiene tutti i micronutrienti, i colloidi e alcune componenti microbiche che sono richiesti per l'accrescimento e l'attività riproduttiva degli organismi marini. Inoltre, può essere conservata per periodi prolungati, al buio e a temperatura ambiente, senza apparente degradazione. Il limite della prima soluzione risiede nel fatto che un effluente può essere saggiato ad una concentrazione massima non superiore all'80 % se la salinità prescelta è del 20‰, od anche del 70% se la salinità voluta è del 30‰ (vedi es. Tab. 1). La seconda soluzione non ha questo limite ma l'aggiunta di sali può, dal canto suo, modificare il pH dell'effluente o dell'eventuale acqua che richiede aggiustamenti, potendo modificare in tal modo anche la tossicità del campione. In generale, si tenga presente che valori di pH al di fuori dell'intervallo 7,5-8,5 sono da considerare come potenziale causa di danno per gli organismi. Se necessario il pH può essere riportato al valore desiderato con aggiunte di HCl o NaOH. Dopo l'aggiunta dei sali la soluzione viene mantenuta in agitazione moderata per circa 60 minuti con l'aiuto di un agitatore magnetico, e ciò per garantire che tutti i sali siano entrati in soluzione prima di introdurre gli organismi.

Tabella 1: Esempio di calcolo dei volumi necessari all'allestimento di un saggio a 7 giorni con un generico effluente di scarico avente salinità trascurabile. L'esempio ipotizza cinque concentrazioni da saggiare in quattro repliche da 500 mL ciascuna, una salinità di 35‰ e l'uso di acqua ipersalina (100‰) e Milli-Q per le diluizioni del campione.

Concentrazione effluente (%, v/v)	Milli-Q (mL)	Effluente (mL)	Ipersalina (mL)
60	100	1200	700
30	700	600	700
15	1000	300	700
7,5	1150	150	700
3,25	1235	65	700

È accettata, infine, anche una terza soluzione con caratteristiche intermedie tra le due descritte (US EPA, 1988). Essa prevede che la concentrazione pari al 100% di campione venga preparata per il test mediante aggiunta di sali, ad ottenere, ad esempio, la salinità del 35‰. La serie delle concentrazioni inferiori è poi allestita diluendo aliquote del campione al 35‰ con acqua di mare alla stessa salinità, che a sua volta è ottenuta miscelando acqua ipersalina con acqua ultrapura.

3.4 Illuminazione

Il saggio a 7 giorni è condotto mantenendo gli organismi nelle stesse condizioni di illuminazione che sono applicate nell'area di allevamento. Le lampade fluorescenti ad ampio spettro, le stesse impiegate per illuminare gli allevamenti degli organismi nel laboratorio, devono fornire, nell'area di sperimentazione, un'intensità luminosa di circa 500-1000 lux con un fotoperiodo di 16 ore luce e 8 ore di buio.

3.5 Temperatura

Le soluzioni da saggiare sono mantenute per tutta la durata della sperimentazione a 25±1°C mediante immersione dei contenitori in bagni termostatati o mediante il condizionamento dell'intero ambiente dedicato alla sperimentazione.

3.6 Alimentazione

Dall'allestimento del saggio sino al 6° giorno dello stesso, gli avannotti di *C. variegatus* sono alimentati quotidianamente con naupli di *Artemia salina* appena schiusi (<24 ore). Il 7° ed ultimo giorno della prova il cibo non viene somministrato.
Nei giorni 0-1-2 si diluiscono 4 mL di sospensione concentrata di naupli di artemia in 80 mL di acqua di mare e si distribuiscono 2 mL della sospensione risultante a ciascun recipiente di saggio. Nei giorni 3-4-5-6 della prova, la quantità di cibo viene aumentata, per cui 6 mL di sospensione concentrata di *A. salina* sono diluiti a 80 mL, mentre resta invariato il volume da distribuire (2 mL/recipiente). Dal momento che i naupli tendono a sedimentare, è importante che la sospensione sia mantenuta omogeneamente dispersa durante la somministrazione ai contenitori di saggio. A parità di altri fattori, infatti, la quantità di cibo disponibile per ciascun gruppo di avannotti è un fattore critico nel determinare il loro accrescimento.
Se nel corso della sperimentazione, la tossicità di un trattamento riduce del 50% o più il numero di avannotti di un contenitore, il quantitativo di naupli somministrato deve essere parimenti dimezzato (1 mL/recipiente).
Per i criteri di scelta e le modalità d'impiego delle cisti di *A. salina* si rinvia al metodo 8070.

3.7 Ossigeno disciolto

Alle concentrazioni di effluente più elevate è maggiore il rischio di una massiccia riduzione della concentrazione di ossigeno disciolto. Ciò rende necessario controllare questo parame-

tro e con particolare attenzione durante le prime ore del saggio. La concentrazione di ossigeno disciolto non deve essere mai inferiore al 40% del valore di saturazione (vedi Tab. 2 Sezione 8090). In caso contrario si deve provvedere all'aerazione delle soluzioni facendo gorgogliare aria compressa priva di contaminanti mediante cannule in vetro. Il flusso d'aria deve essere regolato al minimo livello possibile, in modo tale da soddisfare il criterio di validità del saggio senza causare eccessiva turbolenza od arrecare stress indesiderato agli organismi. Un flusso d'aria pari a 100 bolle/minuto può costituire un limite indicativo che non dovrebbe essere superato. Se si rendesse necessario aerare un trattamento o una concentrazione, anche i restanti devono essere parimenti aerati.

4. Procedura di saggio con diluizione (effluente)

4.1 Saggio preliminare

Se un campione ha tossicità sconosciuta o se si sospetta che esso sia molto tossico, può essere vantaggioso condurre dei saggi di tossicità preliminari per meglio definire l'ambito di concentrazioni entro cui condurre poi il test definitivo.
L'entità delle alterazioni che possono intervenire in un campione durante la sua conservazione, ha più volte confermato la necessità che esso venga saggiato nel più breve tempo possibile. È quindi molto difficile poter condurre col medesimo campione un saggio esplorativo di 7 giorni e un successivo saggio definitivo ed ottenerne dei risultati attendibili. Pertanto, ad eccezione di quegli scarichi la cui tossicità sia marcatamente persistente, solo un saggio a breve termine (24-48 ore) può essere fonte dei dati tossicologici preliminari che sono utili alla sperimentazione definitiva. Un saggio esplorativo di questo tipo deve essere allestito secondo quanto stabilito nella Sezione 8070, condotto alla temperatura di 25±1°C. In merito all'età degli organismi come agli altri aspetti procedurali per quali il metodo ammette un certo ambito di variabilità, è opportuno scegliere quelle condizioni che sono il più possibile simili a quelle del saggio definitivo.
Se infine, si teme che la tossicità del campione non sia per nulla persistente, diventa necessario, all'opposto, l'allestimento immediato del test cronico definitivo, seguendo la procedura descritta nel seguito.

4.2 Saggio definitivo

Per la conduzione della prova definitiva si preparano almeno 5 diluizioni del campione da esaminare. La serie di concentrazioni 100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25% (v/v), che è definita da un fattore di diluizione pari a 0,5, può essere adottata nella generalità dei casi. Se sono disponibili dei dati tossicologici preliminari che evidenziano un diverso intervallo di tossicità, la serie di concentrazioni da saggiare verrà adattata di conseguenza, ricorrendo anche ad un diverso fattore di diluizione o a un maggior numero di concentrazioni.
In ogni caso, a prescindere dalla disponibilità di dati preliminari, è opportuno controllare, nelle prime ore di saggio, gli avannotti esposti alle concentrazioni più elevate. Se si osserva mortalità entro 1-2 ore, è infatti consigliabile ampliare la serie prescelta per la sperimentazione, aggiungendo altre concentrazioni all'estremità inferiore dell'intervallo di tossicità. Proseguendo nell'esempio già proposto, verrebbero allestite le concentrazioni 3,1%, 1,5% e così via.
I volumi di campione necessari alla conduzione del saggio sono prelevati dai contenitori, previo accurato mescolamento, e portati alla temperatura di 25±1°C. Preparate le diluizioni previste con le eventuali correzioni di salinità, si misura la concentrazione di ossigeno disciolto e se questa risultasse prossima o inferiore al limite del 40% del valore di saturazione si devono aerare i contenitori. Solo dopo che le soluzioni hanno raggiunto le condizioni indicate si possono introdurre gli avannotti di *C. variegatus*. Ogni concentrazione di campione è preparata in almeno 3 repliche da 500 mL, e in ciascuna di esse vengono esposte almeno 10 larve di pesce. L'eventuale incremento del numero di repliche o del numero di avannotti per replica, deve basarsi sulla disponibilità orientativa di 50 mL di soluzione per ogni individuo.
Gli organismi vengono distribuiti secondo una sequenza casuale nei diversi contenitori sino al completameneto del numero richiesto. Per evitare di diluire le soluzioni del saggio, è op-

portuno ridurre al minimo il volume d'acqua trasferito con gli organismi, prestando, tuttavia, la massima attenzione a non danneggiare o stressare inutilmente gli avannotti. È necessario limitare l'evaporazione delle soluzioni di saggio per non causare variazioni della salinità e della concentrazione degli inquinanti. Per controllare il fenomeno si possono usare dei fogli di polietilene trasparenti con i quali coprire i recipienti di saggio.
Quotidianamente si ispezionano gli organismi e si provvede al rinnovo delle soluzioni di campione ed alla somministrazione dei naupli di Artemia appena schiusi. Durante il rinnovo delle soluzioni, gli avannotti non vengono rimossi dai contenitori di saggio, e pertanto, prima delle operazioni di ricambio e di alimentazione, si provvede alla pulizia dei contenitori stessi. Con l'aiuto di una pipetta con bulbo in lattice, si rimuovono i naupli di artemia non consumati e gli avannotti deceduti, registrando come tali quelli che non mostrano movimenti opercolari o non reagiscono ad una leggera stimolazione. Si può anche operare utilizzando un sifone, sebbene in tal caso si deve prestare molta attenzione a non aspirare anche gli organismi. Questa soluzione si rivela più pratica per la successiva rimozione del mezzo, e soprattutto se il saggio è condotto con le vaschette illustrate in Fig. 1, in quanto lo scomparto laterale semplifica ulteriormente questa operazione, minimizzando il disturbo degli avannotti. In ogni caso, la soluzione di campione da scartare, viene raccolta in un contenitore avente lo scopo di permettere il recupero degli individui accidentalmente rimossi, oltre alle misure di O_2 disciolto, pH o altri parametri. Raggiunto un volume residuo minimo che sia sufficiente a lasciare le larve immerse, si trasferiscono lentamente nel contenitore di saggio i 500 mL di soluzione fresca. Nel caso delle vaschette menzionate, il comparto laterale serve anche alla operazione di riempimento. Le soluzioni fresche vengono preparate rispettando le stesse condizioni descritte per l'allestimento della prova.
I campioni delle acque da esaminare sono prelevati con modalità e frequenze differenti in relazione agli obiettivi della sperimentazione. La conduzione del saggio a 7 giorni con *C. variegatus* può essere in parte adattata agli obiettivi dell'indagine e alle modalità del campionamento. In pratica si possono distinguere tre diverse soluzioni:

- un solo campione è usato per la conduzione di tutto il saggio, per cui gli organismi sono esposti, quotidianamente, a soluzioni fresche preparate con aliquote del medesimo campione che è conservato al buio e a 4°C;
- il saggio è condotto utilizzando tre campioni prelevati secondo la sequenza d'impiego; il primo campione è usato per l'allestimento e per i primi due rinnovi delle soluzioni di saggio (1° e 2° giorno), il secondo campione serve per il 3° e 4° giorno, ed il terzo per il 5° e 6° giorno della sperimentazione. I tre campioni sono conservati al buio e a 4°C;
- il saggio è condotto utilizzando 7 diversi campioni, prelevati secondo la sequenza d'uso, per cui gli avannotti vengono esposti a delle soluzioni di saggio che sono allestite, come al solito quotidianamente, ma ogni volta con un nuovo campione.

Il saggio termina dopo 7 giorni di esposizione. Allo scadere del 7° giorno si preparano tutti gli organismi sopravvissuti per le successive misurazioni del peso secco.
A questo scopo gli avannotti di ogni contenitore vengono raccolti su di un retino (500 μm), sciacquati ripetutamente con acqua ultrapura e quindi sacrificati mediante immersione in un beaker contenente acqua ultrapura e ghiaccio. Il gruppo di larve è poi trasferito ad una navicella di alluminio, di peso noto, che è posta in stufa a 60°C per 24 ore. Al termine la navicella è raffreddata in essicatore per circa 1 ora e quindi pesata con bilancia analitica.
Ipotizzando l'allestimento minimo di 3 repliche da 10 individui e la completa sopravvivenza degli organismi, si ottengono, secondo la procedura descritta, tre valori di peso medio per ogni trattamento (US EPA, 1988). L'esame statistico degli effetti sull'accrescimento potrebbe risultarne penalizzato, riscontrando differenze significative solo nei casi più evidenti. Si può quindi tentare di raddoppiare il numero delle misurazioni di peso medio dividendo i 10 esemplari di ogni contenitore di saggio in due sottogruppi di 5 avannotti ciascuno. Così facendo l'esame statistico sarebbe basato sul confronto tra gruppi di sei valori di peso secco per ogni trattamento. A causa del peso modesto di un singolo individuo (vedi Capitolo 6), l'ulteriore frazionamento in un maggior numero di sottogruppi aumenterebbe progressivamente il ri-

schio di errore nelle determinazioni del peso secco, a meno di non adottare procedure e strumentazioni adeguate alla misurazione di pesi inferiori a 1 mg.
Se allo scadere del 7° giorno non fosse possibile procedere alle operazioni di essiccamento e pesatura, esse possono essere rinviate. In questo caso è necessario conservare i gruppi di larve di *C. variegatus* in una soluzione di formalina al 4% o di etanolo al 70%.

5. Procedura di saggio senza diluizione (corpo idrico)

5.1 Saggio definitivo

La diluizione esercitata dalle acque marine sulle fonti di contaminazione, spesso riduce la concentrazione degli inquinanti a livelli tali da rendere inutile un saggio che preveda la diluizione del campione. La procedura comunemente adottata per indagare se un'acqua di mare è tossica a livello cronico per *C. variegatus*, consiste pertanto nel condurre un saggio a 7 giorni con un campione "tal quale" (non diluito) delle sue acque.
Il campione di acqua di mare è saggiato in un'unica serie composta da un minimo di 3 repliche corrispondenti alla concentrazione 100% (v/v). Questa viene affiancata, in relazione alle finalità del saggio, da una o più serie di organismi di controllo (vedi anche Paragrafo 3.3). In ogni replica, avente il volume di 500 mL, viene immesso un numero minimo di 10 avannotti di *C. variegatus* di età <24 ore.
Le operazioni di preparazione del campione, rinnovo quotidiano delle soluzioni di saggio, alimentazione delle larve e determinazione del loro peso secco, vengono effettuate seguendo le stesse procedure descritte per il saggio con diluizione (vedi Capitolo 4).
Il confronto, basato su metodi statistici, tra i risultati dei due o più gruppi sperimentali, permette di valutare se l'eventuale inibizione della crescita, o della sopravvivenza, degli avannotti è significativa e quindi imputabile alla presenza di sostanze tossiche.

6. Validità del saggio

I risultati dei saggi sono accettabili se nel corso della sperimentazione la concentrazione di ossigeno disciolto nei diversi trattamenti non è scesa al di sotto del 40% del valore di saturazione, se la sopravvivenza degli avannotti di controllo è ≥80% e se il loro peso secco medio è ≥0,60 mg per singolo individuo. Nel caso la misurazione del peso secco venga effettuata sulle larve conservate (vedi Paragrafo 4.2), il limite di accettabilità si riduce a 0,50 mg per individuo.

BIBLIOGRAFIA

KUNTZ A. (1916): "Notes on the embriology and larval development of five species of teleostean fishes", *Bull. U.S. Bur. Fish.* **34**, 409-429.

NORBERG T.J. & MOUNT D.I. (1985): "A new fathead minnow (*Pimephales promelas*) subchronic toxicity test, *Environ. Toxicol. Chem.*, **4,** 711-718.

US EPA (1988): "Sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) larval survival and growth test", Method 1004. In: *Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to marine and estuarine organisms*. C.I. Weber, W.B. Horning, D.J. Klemm, T.W. Neiheisel, P.A. Lewis, E.L. Robinson, J. Menkedick e F. Kessler, eds. EMSL, US Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, EPA-600/4-87-028.

VIGANÒ L. (1996): "Metodo per la valutazione della tossicità acuta con *Cyprinodon variegatus*", *Notiziario dei Metodi Analitici IRSA*, Settembre1996, 7-16.

8120. Saggio di tossicità prolungato (14-28 giorni) con trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*) (metodo preliminare)

1. Introduzione

Viene proposto un metodo atto alla valutazione di effetti tossici che possono insorgere in trota iridea in seguito all'esposizione prolungata a miscele di inquinanti quali sono quelle comunemente presenti nelle acque di scarico o nei corpi idrici recettori. Si tratta di una proposta di metodo in quanto la procedura non è stata ancora oggetto del consenso e della validazione che sono invece necessari ad un metodo di riferimento. La lunghezza della prova ed i rinnovi frequenti delle soluzioni di saggio rendono necessari volumi relativamente elevati di campione. Tuttavia è probabile che questo aspetto procedurale possa essere sostanzialmente migliorato in una prossima versione del metodo.
In generale, si tenga presente che la variabilità, talvolta elevata, sia delle fonti di contaminazione che del corpo idrico che ne è recapito, possono essere la causa di una corrispondente variabilità degli effetti osservati. Pertanto, la mancata osservazione di effetti tossici con un certo campione o in un preciso momento del regime idrologico del corpo idrico, non escludono che si possano riscontrare degli effetti tossici sperimentando con campioni prelevati in momenti e condizioni idrologiche differenti.

2. Generalità sul metodo

Il saggio di tossicità utilizza giovani individui di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*, in precedenza *Salmo gairdneri*), ovvero individui che sono in fase di crescita attiva. Essi vengono esposti ad un saggio della durata minima di 14 giorni, la cui metodologia è proposta per consentire la valutazione di effetti più tipicamente subletali, quali sono quelli osservabili sull'accrescimento dell'organismo. Tra i vari parametri indagabili, l'accrescimento merita una particolare attenzione in virtù del suo elevato contenuto informativo. Questa peculiarità deriva dal fatto che l'accrescimento di un organismo è l'espressione ultima di molteplici aspetti, sia di natura biochimica, fisiologica come anche comportamentale, tutti potenzialmente alterabili in vario grado quando un organismo venga esposto ad una miscela di contaminanti.
In ogni caso, il metodo si presta alla valutazione anche degli effetti letali che pure potrebbero manifestarsi a causa dell'esposizione prolungata ai contaminanti.
Per effettuare un saggio di questo tipo su acque di scarico, un minimo di cinque gruppi di individui viene esposto ad altrettante diluizioni del campione da esaminare. Il numero di decessi eventualmente osservati può essere utilizzato per calcolare la concentrazione di campione che è letale al 50% degli organismi (LC_{50}) e a diversi tempi di esposizione. Peraltro, proprio perchè nelle acque di scarico sono facilmente osservabili elevate concentrazioni di inquinanti, è opportuno scegliere delle diluizioni tali da non causare elevate mortalità e permettere, al contrario, la sopravvivenza degli organismi e l'osservazione degli effetti subletali. Gli effetti osservati nei gruppi di trote esposte alle diluizioni di campione vengono confrontati con individui di controllo che sono stati mantenuti in condizioni sperimentali analoghe ma in assenza di campione. Mediante tale confronto, che è condotto con metodi statistici, è possibile determinare quale diluizione del campione non esercita effetti significativi sull'accrescimento di trota iridea (NOEC).
Per condurre il saggio sulle acque di un corpo idrico si può adottare lo stesso schema sperimentale proposto per gli effluenti di scarico. Frequentemente, tuttavia, questo tipo di saggio è condotto esponendo i pesci ad un campione non diluito ("tal quale") evitando che la procedura di diluizione applicata al campione ne riduca eccessivamente la concentrazione degli

inquinanti, di per sè raramente elevata, precludendo l'osservazione di effetti significativi. Nel caso venga saggiato un campione non diluito l'analisi statistica dei risultati si limiterà a stabilire se il gruppo di organismi esposti manifesta alterazioni significative dell'accrescimento o eventualmente della sopravvivenza.

3. Conduzione del saggio

3.1 Materiali e strumentazione

Oltre alla comune strumentazione di laboratorio, la conduzione del saggio di tossicità richiede:

- vasche o recipienti in vetro aventi capacità netta di almeno 40-50 L e che consentano di mantenere un livello del liquido non inferiore a 15 cm; l'adozione di volumi diversi deve sempre soddisfare il limite di carico di biomassa che è fissato indicativamente nel valore massimo di 0,5 g/L·giorno^{-1}
- retini di varie dimensioni per il trasferimento dei pesci;
- reti o coperture trasparenti in materiale atossico per evitare la fuoriuscita degli animali dalle vasche;
- dispositivo atto alla termostatazione delle soluzioni a 15±1°C. Il condizionamento dell'ambiente di lavoro o l'immersione dei recipienti di saggio in bagni termostatati sono tra le soluzioni più comunemente adottate;
- sistema di lampade fluorescenti ad ampio spettro provvisto di temporizzatore e preferibilmente di un dispositivo per la transizione graduale tra le fasi di luce e di buio;
- analizzatore di ossigeno disciolto;
- sistema di aerazione a bassa pressione fornito di diffusori a pietra porosa e/o cannule in vetro. Gli aeratori commercializzati in acquariofilia soddisfano appieno le necessità della sperimentazione. Nel caso si ricorra ad impianti centralizzati per aria compressa, è necessario adottare idonei sistemi di filtrazione per rimuovere oli ed altri vapori organici che sono contaminanti frequenti.

Tutti gli oggetti che sono destinati ad entrare in contatto con l'acqua di diluizione o di mantenimento, o con i campioni da saggiare, debbono essere realizzati con materiali inerti, che non adsorbano i tossici significativamente e che tanto meno ne possano rilasciare. Il vetro borosilicato e le plastiche florurate dovrebbero essere impiegati ovunque possibile. Gli oggetti costruiti con questi materiali possono essere riutilizzati dopo le necessarie procedure di pulizia. Materie plastiche quali il polietilene, il polipropilene, il Tygon®, o altre ancora, possono trovare usi limitati nell'apparato sperimentale mentre sono da considerare assolutamente come "monouso" se impiegate nel prelievo e nel trasporto dei campioni da saggiare. Al contrario, contenitori costruiti con questi materiali, con il polietilene ad alta densità in particolare, ben si prestano ad essere specificamente riutilizzati per conservare acque di diluizione o acque sintetiche preparate in laboratorio. In ogni caso si raccomanda che a prescindere dalla natura dei materiali prescelti, sia i recipienti che gli accessori vengano sciacquati accuratamente, meglio se in flusso continuo, con l'acqua di diluizione o di mantenimento prima del loro impiego nei saggi.

3.2 Organismi per il saggio

Si utilizzano giovani esemplari di trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*), che sono disponibili, quasi per l'intero arco dell'anno, presso gli allevamenti ittici specializzati in troticoltura. In relazione alle condizioni esistenti in allevamento o a quelle di mantenimento in laboratorio, può rendersi necessario acclimatare gli organismi alle condizioni previste per la sperimentazione. Ciò è ottenibile mediante un periodo di acclimatazione che deve avere una durata minima di 7 giorni e preferibilmente di un paio di settimane. Durante il periodo di mantenimento e acclimatazione le trotelle vengono alimentate con un quantitativo giornaliero minimo di cibo che deve essere equivalente all'1-2% del loro peso fresco (ECETOC, 1986; ISO, 1992; OECD,

1994). Per ulteriori dettagli in merito al trasporto ed alla acclimatazione degli organismi si rinvia all'Appendice A2 della Sezione 8080 per la valutazione della tossicità acuta con trota iridea.
Come verrà chiarito nel seguito, il saggio può essere organizzato secondo due diverse soluzioni sperimentali che condizionano la scelta delle dimensioni degli organismi. Tuttavia, alcuni aspetti procedurali, che tra l'altro sono comuni ad entrambe le soluzioni sperimentali, limitano la scelta delle dimensioni ad un ambito relativamente ristretto. Infatti, da un lato, è necessario rispettare il carico di biomassa, che è fissato indicativamente al valore massimo di 0,5 $g/L \cdot d^{-1}$, mentre all'opposto, la manualità necessaria alla misurazione della lunghezza e del peso degli organismi, preclude una riduzione eccessiva della loro taglia.
In accordo con la prima soluzione sperimentale ("a"), ogni individuo deve essere identificabile per l'intera durata del saggio, il che è ottenibile solo mediante un intervento di marcatura. La procedura di marcatura, la cui tecnica è descritta nelle pagine successive, richiede che la trotella abbia una taglia minima tale da poter essere facilmente manipolabile, ma senza eccedere nelle sue dimensioni, che pur nel rispetto del carico di biomassa, finirebbero col penalizzare inaccettabilmente l'entità dei volumi di campione necessari, nonchè le dimensioni dell'apparato sperimentale. Trote che, al momento dell'allestimento del saggio, hanno un peso compreso tra 3 e 5 g, cui corrisponde indicativamente una lunghezza corporea tra 6 e 8 cm, sono idonee agli scopi indicati.
La seconda soluzione sperimentale ("b") esclude la marcatura dei pesci, nel qual caso ci si potrà avvalere dei vantaggi offerti dall'uso di organismi di minori dimensioni che, tra l'altro, consentono di rispettare molto più facilmente il limite stabilito per il rapporto "peso dei pesci/volume di soluzione" (~ 0,5 $g/L \cdot d^{-1}$). La necessità di manipolare gli organismi per misurarne peso e lunghezza impone, comunque, un limite inferiore alla loro taglia, pena il rischio di mortalità dovute alla eccessiva delicatezza degli organismi stessi. È quindi opportuno non scendere al di sotto dei 3 cm, cui corrisponde, indicativamente, un peso fresco di circa 0,5 g.
In questo tipo di saggio è di fondamentale importanza l'omogeneità di taglia degli organismi. Pertanto è necessario adottare una serie di accorgimenti il cui scopo ultimo è di ottenere un gruppo di circa 100-130 trote che all'allestimento del saggio abbiano un peso corporeo compreso entro un ambito di ±10% del loro peso medio. La lunghezza di un tale gruppo di organismi si dimostra compresa entro un ambito ancora più ristretto del valore di lunghezza media (Crossland, 1985). Per ottenere questo grado di omogeneità è necessario scegliere organismi il più possibile coetanei, meglio se appartenenti alla stessa schiusa, selezionarne la taglia già dalle prime fasi di mantenimento in laboratorio, scartando gli individui con dimensioni estreme, con comportamento marcatamente territoriale o, peggio, che praticano il cannibalismo. Condizioni idonee di mantenimento e acclimatazione contribuiscono, a loro volta, al raggiungimento dell'obiettivo (vedi Appendice A2 della Sezione 8080).
Per la misurazione della lunghezza corporea si può optare per uno dei 3 tipi di misurazioni possibili. A partire dall'estremità anteriore del capo, e più precisamente della mascella, esse hanno un diverso riferimento posteriore, terminando, rispettivamente, all'estremità della pinna caudale (lunghezza totale), al suo punto di biforcazione o all'estremità del peduncolo caudale (lunghezza standard) (Fig. 1). Quest'ultima misurazione è generalmente quella da preferire.

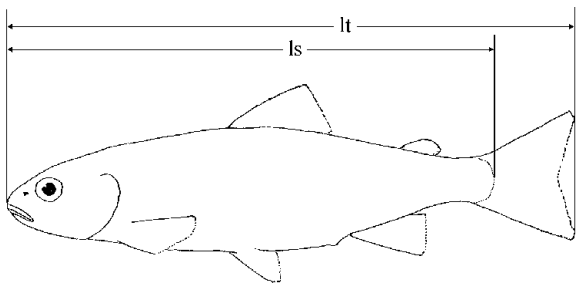


Figura 1: Riferimenti per la misurazione della lunghezza totale (lt) e della lunghezza standard (ls) del corpo del pesce.

Nel giorno di allestimento del saggio vengono misurati il peso e la lunghezza media di un campione di trotelle che sia rappresentativo degli organismi medi del lotto destinato alla sperimentazione. In questo modo si ottiene una stima attendibile del peso e della lunghezza media degli organismi del lotto in esame, in base alla quale e nel rispetto dell'ambito indicato (±10%), si può procedere alla selezione definitiva delle trote che potranno essere immesse nelle vasche di saggio.
Per misurare accuratamente peso e lunghezza dei singoli individui è consigliabile che essi vengano anestetizzati. A questo scopo si prepara una vaschetta contenente una soluzione di alcuni litri di un anestetico, quale la tricaina (MS-222) o sostanza equivalente (es. benzocaina), alla concentrazione di 50-100 mg/L (ECETOC, 1986; ISO, 1992), debolmente aerata ed alla temperatura di 15±1°C. Trattandosi di misurazioni di peso fresco è necessario adottare piccoli accorgimenti che minimizzino il rischio di errore dovuto alla presenza di gocce d'acqua sul corpo del pesce; esse possono essere rimosse, ad esempio, con carta da filtro o simile, senza tuttavia danneggiare lo strato di muco protettivo. Se il pesce anestetizzato risponde ai requisiti di peso e lunghezza desiderati, si procede all'eventuale operazione di marcatura (soluzione sperimentale "a"), dopo di che il pesce viene immesso in un vaschetta simile alla precedente ma contenente solo acqua di acclimatazione/diluizione (15±1°C), si attende che si riprenda dall'anestesia e si trasferisce definitivamente alla vasca di saggio. La stessa procedura, marcatura esclusa, viene seguita anche nel caso in cui non sia prevista l'identificazione degli organismi (soluzione sperimentale "b").
Rispetto ad altre tecniche, la marcatura per congelamento si è dimostrata relativamente semplice e senza danno per gli organismi (Crossland, 1985). Essa si effettua operando come segue: il marchio è realizzato sagomando del filo d'acciaio a forma di lettera o di numero, questo viene raffreddato in azoto liquido e pressato leggermente, per tre secondi, sul fianco del pesce anestetizzato, poco al di sotto della pinna dorsale. Il marchio, che subito dopo l'operazione è invisibile, si rende progressivamente evidente nelle successive 48 ore e permane chiaramente visibile per almeno sei settimane. È preferibile evitare i marchi che comprendono sagome circolari (chiuse) poichè favoriscono l'insorgenza di infezioni cutanee (ISO, 1992). In Fig. 2, sono riprodotte delle sagome idonee. La superficie del marchio deve essere priva di asperità e piatta, in modo che durante la marcatura, la cute non venga lesa in alcun modo e sia sottoposta ad una pressione omogenea in corrispondenza all'intero simbolo del marchio.
Tutte le operazioni descritte devono essere condotte rapidamente e ponendo la massima attenzione a non danneggiare in alcun modo gli organismi. Gli individui sopravvissuti ad un saggio non potranno venire riutilizzati in prove successive.

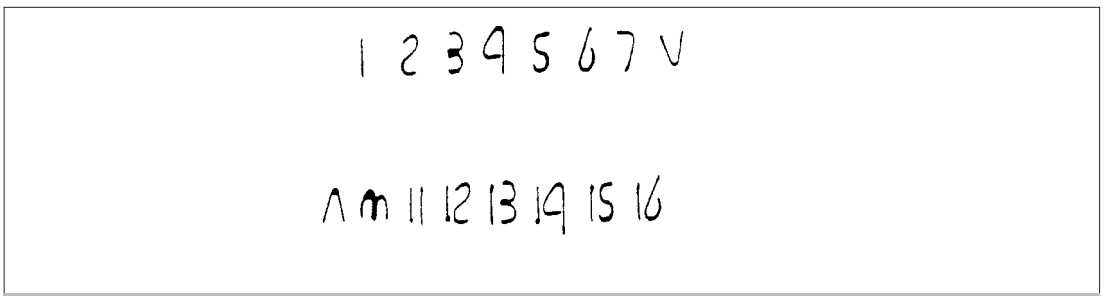


Figura 2: Esempi di sagome idonee alla marcatura dei pesci (ISO, 1992).

3.3 Acqua di diluizione

Generalmente le diluizioni del campione da saggiare ed il controllo vengono allestiti con la stessa acqua usata per il mantenimento delle trotelle o quella eventualmente usata per l'acclimatazione. In relazione agli obiettivi del saggio sono utilizzabili, tuttavia, altre acque di diluizione o di controllo e si rende quindi necessario distinguere tra alcune possibili soluzioni.

a) Se lo scopo è di evidenziare la presenza di effetti tossici cronici in un effluente o nelle acque di un corpo idrico, studiandone l'andamento nel tempo o confrontando il grado di con-

taminazione di diverse aree, come diluente e controllo si adotterà un'acqua sintetica (standard) preparata per aggiunta di sali di grado analitico ad acqua deionizzata di buona qualità o Milli-Q. Per un litro di acqua standard si solubilizzano nell'ordine: 10 mg di KCl, 192 mg di $NaHCO_3$, 53 mg $MgSO_4$ e 183 mg $CaSO_4$ $2H_2O$. Il mezzo così ottenuto ha le seguenti caratteristiche: pH 7,5-8,5, durezza 140-160 mg $CaCO_3$/L, alcalinità 110-120 mg $CaCO_3$/L, Ca/Mg >1 e prossimo a 4, Na/K >1 e prossimo a 10.

b) Se lo scopo del saggio è di valutare la tossicità derivante dall'immissione di uno scarico nelle acque del recettore, come diluente e controllo si userà l'acqua non contaminata del recettore, prelevata a monte dell'immissione o comunque al di fuori dell'area contaminata. Nel caso essa non sia disponibile, si può utilizzare un'acqua prelevata da un altro corpo idrico superficiale o un'acqua sintetica (vedi "punto a") avente approssimativamente le stesse caratteristiche chimiche e, in particolare, la stessa durezza del corpo idrico recettore oggetto del controllo. In qualche caso è anche possibile operare modificando la composizione di un'acqua naturale, purché di qualità adeguata, previa aggiunta di sali (reagenti di grado analitico) e nelle quantità necessarie. Il prelievo di acque naturali deve essere effettuato immediatamente prima del loro impiego e comunque non oltre le 96 ore dallo stesso, mantenendo i campioni refrigerati (4°C) e al buio quando se ne faccia uso a più di 24 ore dalla raccolta. Se si sospetta che l'acqua del recettore, per proprie caratteristiche, possa modificare l'accrescimento degli organismi, è preferibile allestire un secondo gruppo di controllo nel quale gli individui sono esposti all'acqua comunemente utilizzata per il mantenimento o l'acclimatazione.

c) Se, infine, lo scopo del saggio è quello di esaminare le interazioni tra i contaminanti presenti nello scarico e quelli veicolati dal recettore, come acqua di diluizione si userà quella del recettore stesso, indipendentemente dal suo grado di contaminazione, prelevata a monte o comunque al di fuori dell'influenza dello scarico in esame. Questo terzo tipo di saggio richiede l'allestimento di due gruppi di organismi di controllo. Nel primo i pesci sono esposti all'acqua recettrice, quella cioè che già possiede, verosimilmente, un proprio grado di contaminazione. Nel secondo, i pesci sono esposti all'acqua del recettore prelevata da un'area non contaminata. In analogia al saggio precedente, se si sospetta che l'acqua del recettore possa di per sè alterare, in qualche misura, la risposta degli organismi, si può prevedere un terzo gruppo di controllo nel quale i pesci sono mantenuti nell'acqua comunemente utilizzata per il mantenimento o l'acclimatazione.

3.4 Illuminazione

Durante il saggio vengono mantenute le stesse condizioni di illuminazione cui gli animali sono stati acclimatati. Il fotoperiodo comunemente adottato è di circa 16 ore di luce e 8 ore di buio. Deve essere evitata la luce solare diretta optando invece per le intensità luminose pari a quelle comunemente riscontrabili nei laboratori (500-1000 lux) o più attenuate.

3.5 Temperatura

La temperatura di tutte le soluzioni da saggiare deve essere mantenuta a 15±1°C per l'intera durata della sperimentazione.

3.6 Alimentazione

Fatta eccezione per particolari finalità sperimentali, il cibo da somministrare è lo stesso impiegato nell'allevamento da cui provengono gli organismi. Si tratta solitamente di mangimi secchi, pellettizzati, aventi composizione e dimensione adeguata alla taglia delle trote da nutrire.

Durante la prova i pesci sono alimentati quotidianamente con una quantità di cibo che deve essere equivalente al 4% del loro peso fresco. È consigliabile somministrare tale quantitativo suddividendolo in due porzioni distanziate di almeno 5 ore. Se necessario, la somministrazione del cibo può essere affidata ad accessori automatizzati reperibili in acquariologia.

A parità di altre condizioni, la velocità di crescita è strettamente dipendente dalla quantità di

cibo disponibile. Pertanto, il parametro alimentazione deve essere attentamente controllato. Per i primi 14 giorni di saggio la quantità di cibo giornaliera è calcolata in relazione al peso degli organismi al "tempo 0", e cioè quello misurato nella fase di allestimento del saggio. Se è necessario prolungare il test fino a 28 giorni, la dieta deve essere ricalcolata basandosi sulle misurazioni di peso fresco ottenute al 14° giorno. Qualora si verifichino dei decessi nel corso della sperimentazione, è parimenti necessario ricalcolare la dieta adeguandola alla minore biomassa presente. Viceversa, non è accettabile la conservazione della biomassa complessiva mediante sostituzione dei pesci deceduti con nuovi organismi di taglia similare (OECD, 1994).
La somministrazione del cibo deve essere interrotta 24 ore prima delle determinazioni di peso fresco degli organismi, evitando così che il contenuto dell'apparato digerente possa interferire in modo significativo. L'alimentazione viene, quindi, sospesa prima dell'allestimento del saggio (cfr. par. 3.2), come pure al 13° e al 27° giorno di trattamento, in preparazione alle misure di accrescimento.

3.7 Ossigeno disciolto

È necessario misurare quotidianamente la concentrazione di ossigeno disciolto e più frequentemente durante le prime ore del saggio. Essa deve risultare ≥60% del valore di saturazione. Nei test statici, soprattutto alle concentrazioni più elevate di effluente di scarico, è frequente che l'ossigeno disciolto scenda al di sotto del limite indicato. È necessario in questi casi aerare le soluzioni del saggio facendovi gorgogliare aria priva di contaminanti. Compatibilmente con il tenore di ossigeno richiesto, l'aerazione deve essere regolata sul minimo flusso possibile, sia per evitare che l'eccessiva turbolenza arrechi disturbo agli organismi che per minimizzare la perdita di eventuali tossici volatili o facilmente ossidabili. Se si utilizzano pipette o cannule in vetro per l'aerazione delle vasche, si può fissare, indicativamente, a 100 bolle/minuto il flusso massimo di aria insufflata.

4. Procedura di saggio con diluizione (effluente)

4.1 Saggio preliminare

Quando è disponibile una certo numero di dati tossicologici sull'effluente da esaminare, un saggio preliminare può ritenersi superfluo e si procede ad allestire direttamente il saggio definitivo, al più adottando qualche cautela in relazione a un certo grado di variabilità delle fonti di contaminazione. Al contrario, se ci si appresta alla conduzione di un saggio con un effluente di qualità sconosciuta, è consigliabile acquisire dei dati preliminari sul suo grado di tossicità, e ciò al fine di impostare correttamente l'intervallo di concentrazioni entro cui sperimentare.
Un saggio preliminare consiste normalmente in una prova semplificata, condotta con un minor numero di organismi ed una serie di concentrazioni ampiamente spaziate tra loro. Tuttavia, la limitata conservabilità dei campioni e soprattutto la durata del saggio in esame, rendono improponibile la conduzione di un saggio preliminare e successivamente di quello definitivo. Anche in quei casi in cui la tossicità è persistente, è dunque preferibile utilizzare un saggio a breve termine (acuto) per ottenere quei dati tossicologici preliminari che sono utili all'allestimento del saggio definitivo.
L'eventuale saggio esplorativo deve essere quindi condotto secondo quanto prescritto dalla Sezione 8080, avendo cura di adottare, ovunque possibile, le stesse condizioni del saggio cronico definitivo, quali il carico di biomassa, l'acqua di diluizione, nonchè la taglia degli organismi, meglio se appartenenti allo stesso lotto. Se la prova preliminare dimostra che lo scarico in esame è capace di effetti tossici acuti, si può suggerire di adottare la minima concentrazione che ha causato dei decessi come la massima che sarà saggiata nella prova definitiva. Disponendo di informazioni tossicologiche più esaurienti, si può optare per l'adozione di una concentrazione massima compresa tra un 1/3 e un 1/10 della $96hLC_{50}$, rispettivamente nel caso sia stata evidenziata, o meno, la soglia letale incipiente (ISO, 1992).

4.2 Saggio definitivo

Nei saggi sull'accrescimento, come quello qui descritto, è stato osservato che la variabilità tra repliche costituite da gruppi di organismi, è generalmente molto più modesta della variabilità esistente all'interno della singola replica, quella che origina, cioè, dalle risposte dei singoli individui che la compongono (OECD, 1994). Il confronto tra organismi sembra quindi più informativo che non il confronto tra gruppi di organismi, o in altre parole, l'uso del singolo organismo come di una replica, sembra essere l'impostazione sperimentale da preferire.
Per condurre il saggio definitivo si preparano almeno 5 diluizioni del campione di effluente più i necessari trattamenti di controllo, e tutti vengono allestiti singolarmente in volumi di almeno 40-50 L ciascuno. Se le informazioni tossicologiche preliminari non suggeriscono una diverso intervallo di sperimentazione, le diluizioni di effluente di scarico da adottare sono le seguenti: 100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25% (v/v). Queste diluizioni sono in serie geometrica, con fattore di diluizione pari a 0,5.
Se è stato necessario refrigerare i campioni, i volumi necessari alla conduzione del saggio vengono prelevati dai contenitori, dopo accurato mescolamento, e portati alla temperatura di 15±1°C. Preparate le diluizioni previste, si misura la concentrazione di ossigeno disciolto e se questa risultasse prossima o inferiore al limite del 60% del valore di saturazione si procede ad aerare i contenitori (vedi Paragrafo 3.7). Solo quando le soluzioni hanno raggiunto le condizioni indicate si possono introdurre i pesci opportunamente selezionati per taglia ed eventualmente marcati (vedi Paragrafo 3.2). Si raccomanda che il trasferimento degli organismi ai contenitori del saggio venga effettuato con gli appositi retini, rapidamente e con la massima cura, al fine di minimizzare lo stress e non danneggiare gli organismi.
In ogni soluzione viene trasferito un numero minimo di 10 trote per ciascuna delle quali è stato registrato il peso e la lunghezza, oltre all'eventuale marchio di identificazione (OECD, 1984). Tuttavia, compatibilmente con il carico di biomassa (~0,5 $g/L \cdot d^{-1}$), è preferibile usare un maggior numero di individui, nell'ordine di 15-20 per ogni soluzione di saggio (ISO, 1992; OECD, 1994), rinunciando eventualmente alla loro marcatura che, come già indicato, richiede pesci di maggiori dimensioni.
Particolarmente nei casi in cui non siano disponibili dati preliminari, è consigliabile che gli organismi esposti alle concentrazioni più alte, vengano osservati, con maggiore frequenza, durante le prime ore di esposizione. Qualora l'effluente possieda un elevato grado di tossicità, sono infatti queste le concentrazioni in cui i pesci manifesteranno più rapidamente i sintomi di una intossicazione acuta in atto, e ciò è tanto più importante a causa della lunghezza del saggio. L'osservazione di effetti tossici nelle prime ore della sperimentazione lascia infatti prevedere che una frazione troppo modesta degli organismi impiegati potrà sopravvivere fino al termine della prova, verosimilmente un frazione così esigua da escludere la produzione di risultati significativi sull'inibizione dell'accrescimento. Nel caso ipotizzato si renderebbe necessario migliorare l'intervallo di sperimentazione indicato, allestendo rapidamente altre concentrazioni di effluente, quali 3,1%, 1,5%, 0,75%, ed adeguando i tempi di osservazione in base al ritardo di allestimento.
Quotidianamente si provvede alla somministrazione della dieta ed alla pulizia delle vasche. Si registrano e si rimuovono gli organismi deceduti e si registra ogni altra alterazione osservabile quale il cambiamento della colorazione, la perdita di equilibrio, il nuoto scoordinato, l'aumentata velocità respiratoria ed altre ancora. Nel rispetto del rapporto di carico si deve provvedere anche al rinnovo delle soluzioni di saggio che, in ogni caso, dovrebbe essere effettuato almeno una volta ogni 48 ore.
Al 13° giorno viene sospesa la somministrazione del cibo ed al 14° i pesci vengono nuovamente anestetizzati, e si procede alla misura del peso e della lunghezza che essi hanno raggiunto (vedi Paragrafo 3.2). In base agli obiettivi del saggio ed ai risultati ottenuti dai primi 14 giorni di esposizione, si può decidere di prolungare la sperimentazione sino al compimento del 28° giorno. In questo caso restano valide tutte le indicazioni e i suggerimenti forniti per la conduzione della prima parte del saggio.

5. Procedura di saggio senza diluizione (corpo idrico)

5.1 Saggio definitivo

Allo scopo di saggiare se in un corpo idrico sono presenti sostanze tossiche a concentrazioni tali da inibire l'accrescimento di trota iridea, si espone un certo numero di individui ad un campione non diluito delle sue acque. L'adozione di tale procedura deriva dal favorevole rapporto di diluizione che normalmente esiste tra le fonti di contaminazione e il corpo idrico recettore, per cui le concentrazioni degli inquinanti sono raramente tali da richiedere una diluizione per poter completare con successo l'osservazione di effetti subletali.
Naturalmente, se si sospetta un elevato grado di tossicità o si hanno dati pregressi che ne diano conferma, può rivelarsi vantaggioso allestire alcune diluizioni del campione del corpo idrico in esame. Nel qual caso è necessario attenersi alla procedura di saggio per effluenti descritta al Paragrafo 4.2.
Anche in questo tipo di saggio il trattamento espositivo viene effettuato in una singola replica, o meglio, utilizzando una sola vasca nella quale le trote, accuratamente selezionate in base alla taglia, vengono esposte all'acqua del corpo idrico "tal quale" (100% v/v). I singoli individui, eventualmente marcati, divengono in tal modo le repliche del trattamento e le loro risposte verranno confrontate con quelle di uno o più gruppi di individui di controllo esposti ad acque naturali o sintetiche in funzione delle finalità della prova (vedi Paragrafo 3.3).
Il numero degli organismi per ogni trattamento deve essere almeno di 10 ma sono certamente da preferire gruppi più consistenti, prossimi a 20. I diversi aspetti della procedura sperimentale quali, ad esempio, la dimensione delle trote, l'alimentazione durante la prova, la misurazione della lunghezza e del peso, la durata del saggio e così via, sono da considerare comuni alla metodica di saggio per acque di scarico e si rinvia, pertanto, ai paragrafi precedenti.

6. Validità del saggio

I risultati dei saggi sono considerati validi se tra gli organismi del controllo si osserva una mortalità del 10% e se la concentrazione di ossigeno disciolto non scende al di sotto del 60% del valore di saturazione.

7. Espressione dei risultati

Al termine del saggio vengono riportati i valori di peso fresco, lunghezza e velocità di crescita dei singoli organismi.
Se i pesci sono stati marcati (soluzione sperimentale "a"), per ciascuno di essi è possibile calcolare la velocità specifica di crescita (r_1) secondo la seguente espressione:

$$r_1 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

dove w_1 e w_2 rappresentano il peso del pesce ai tempi t_1 e t_2, rispettivamente inizio e termine, del periodo sperimentale considerato (ISO, 1992; OECD, 1994). Se i pesci non sono stati marcati (soluzione sperimentale "b"), non è possibile disporre per uno stesso individuo delle misurazioni ai tempi t_1 e t_2, e pertanto non è calcolabile il valore di r_1. Tuttavia si può ottenere una valutazione di tipo intermedio che consiste nel calcolo della velocità di crescita "pseudo" specifica (r_2) attraverso la seguente formula:

$$r_2 = \frac{\log_e w_2 - \log_e w(medio)_1}{t_2 - t_1} \times 100$$

In pratica, non potendo fare riferimento al peso del pesce al tempo t_1, l'accrescimento dell'organismo in esame viene valutato usando come riferimento il peso medio dell'intero gruppo di pesci immesso nella vasca al tempo t_1, che è indicato come $w(medio)_1$ (OECD, 1994). Mediante opportuni metodi statistici i valori di lunghezza, di peso fresco e di velocità di crescita (r_1 o r_2) determinati per gli organismi esposti al campione "tal quale" o a sue diverse concentrazioni, vengono confrontati con i valori corrispondenti degli organismi di controllo. Se vengono dimostrate differenze statisticamente significative per almeno uno dei parametri, si può affermare che il campione contiene concentrazioni di contaminanti tali da ridurre l'accrescimento di trota iridea e se si dispone di più livelli di effetto, per una serie scalare di concentrazioni, diventa possibile individuare la diluizione di "non effetto" (NOEC) del campione in esame.

BIBLIOGRAFIA

CROSSLAND N.O. (1985): "A method to evaluate effects of toxic chemicals on fish growth", *Chemosphere,* **14**, 1855-1870.

ECETOC (1986): *"The EEC sixth amendment: prolonged fish toxicity tests"*, Technical Report No. 24, Brussels, Belgium, pp 36.

ISO (1992): *"Water quality - Determination of the prolonged toxicity of substances to freshwater fish. Part 1: Method for evaluating the effects of substances on the growth rate of Oncorhynchus mykiss Walbaum (Teleostei, Salmonidae)",* Draft International Standard, ISO/DIS 10229-1.

OECD (1984): *"OECD guidelines for testing of chemicals. Fish, prolonged toxicity test: 14-day study",* Guideline No. 204.

OECD (1994): *"OECD guidelines for testing of chemicals. Proposal for fish, juvenile growth test - 28 days"* Revised Draft Document, TG\94.214\No-vember 1994.

VIGANÒ L. (1996): "Metodo per la valutazione della tossicità acuta con trota iridea (*Oncorhynchus mykiss*)", *Notiziario dei Metodi Analitici IRSA*, Settembre 1996, 17-25.

8130. Analisi statistica dei risultati di saggi cronici

Questa nota si propone di fornire solo i criteri guida essenziali per poter effettuare una corretta elaborazione dei risultati. In commercio sono disponibili dei programmi per personal computer che permettono di applicare con relativa facilità gran parte dei metodi di interesse tossicologico, tra i quali anche quelli citati in questa nota. L'esistenza di tali programmi, l'elevato numero dei metodi che andrebbero trattati e la loro relativa complessità, ha fatto sì che, al contrario di quanto fatto in precedenza, l'operazione di darne descrizione dettagliata fosse ritenuta inopportuna. Per contro, la relativa facilità d'uso dei programmi disponibili in commercio non deve fuorviare e si consiglia di avvalersi sempre della collaborazione di un esperto di statistica che possa consigliare sulla scelta dei metodi di analisi più appropriati ai singoli casi sperimentali.

I saggi cronici proposti consentono di esaminare gli effetti a lungo termine di effluenti di scarico o di acque superficiali su parametri quali l'attività riproduttiva, l'accrescimento ed anche la sopravvivenza degli organismi. L'analisi statistica dei risultati ottenuti con questi saggi viene comunemente distinta in base al tipo di risultato da esaminare ed, ovviamente, in base al tipo di informazione che si desidera ottenere.

Nel caso un campione sia stato saggiato solo "tal quale", lo scopo dell'analisi statistica è di confrontare le risposte degli organismi che sono stati esposti a questa unica concentrazione di campione con quelle degli organismi di controllo e di valutare se le eventuali differenze, ad esempio di taglia corporea, siano da considerare significative e quindi imputabili agli inquinanti presenti nel campione stesso. A questo scopo si utilizza generalmente il test *t* con il quale è possibile valutare, con un certo grado di probabilità, se, ad esempio, la dimensione media degli animali di controllo sia significativamente diversa da quella dei trattati, e rifiutare pertanto l'ipotesi di differenza nulla (H_o). L'applicabilità di questo test richiede che i due campioni posti a confronto provengano da popolazioni normalmente distribuite e soprattutto che le varianze dei due gruppi di osservazioni non siano significativamente differenti.

Nel caso sia stato possibile saggiare più diluizioni di un campione si dovranno analizzare più serie di dati relativamente ad uno od anche più parametri. Queste serie andranno confrontate con la/e serie corrispondenti degli organismi di controllo. Lo scopo è comunemente quello di individuare la massima concentrazione di campione i cui effetti non sono significativi, od anche, quella concentrazione di campione alla quale gli organismi possono essere esposti senza che i valori dei parametri misurati siano statisticamente distinguibili da quelli del gruppo di controllo. Questa concentrazione viene indicata con l'acronimo NOEC e viene solitamente individuata congiuntamente con la minima concentrazione, tra quelle saggiate, che è stata capace di effetti significativi (LOEC). La procedura corretta è in questo caso l'analisi della varianza (ANOVA), mentre, al contrario, sarebbe inappropriato applicare ripetutamente il "test" *t* alle diverse coppie costituite da uno dei trattamenti e dal controllo. I presupposti per la corretta applicazione di ANOVA sono che i dati siano distribuiti normalmente e che la varianza dei gruppi sia omogenea. La prima condizione viene verificata con il "test" del Chi quadrato o con un "test" alternativo (es. Shapiro-Wilks), mentre la seconda, una volta soddisfatta la condizione di normalità, può essere verificata con il "test" di Bartlett o, parimenti, con test alternativi. Soddisfatte tali premesse, l'applicazione di ANOVA ad un criterio di classificazione, permetterebbe di concludere, in caso affermativo, che le differenze tra le medie dei diversi gruppi sperimentali sono significative. La verifica di variazione significativa tra i gruppi ottenuta mediante ANOVA è tuttavia un risultato generico che poco aggiunge alla caratterizzazione tossicologica del campione. Per ottenere informazioni più specifiche è necessario applicare altri metodi statistici il cui scopo, coerentemente con quanto anticipato, è quello di individuare quali tra le concentrazioni di campione abbiano causato alterazioni si-

gnificative del parametro in esame. Un test comunemente utilizzato a questo scopo è quello di Dunnett, poichè confronta ogni gruppo di organismi con il controllo. Tuttavia esistono vari metodi alternativi o complementari come, ad esempio, il "test" di Bonferroni, che è da preferire nel caso i gruppi abbiano un diverso numero di repliche, oppure il "test" di Williams, che è specifico per analizzare le risposte a concentrazioni crescenti di tossici, o il "test" di Tukey che è preferibile qualora si sia interessati a confrontare tutti i gruppi tra loro, non potendo presupporre, come in taluni studi di campo, che vi siano relazioni evidenti tra i diversi trattamenti. In generale è preferibile escludere da questi confronti i dati relativi ai trattamenti che hanno causato elevate mortalità.
Se i dati non rispettassero la condizione di normalità o di omogeneità della varianza può essere risolutivo trasformarne i valori nei rispettivi logaritmo, radice quadra o arcoseno e risottoporli ai test statistici menzionati. Una valida alternativa è rappresentata, tuttavia, dall'impiego di metodi statistici di tipo non parametrico che non sono condizionati, nella loro applicazione, dalla distribuzione dei dati, e possono pertanto essere utilizzati senza alcuna trasformazione dei dati medesimi. I test proponibili in tal senso sono, ad esempio, il metodo di Steel, analogo non parametrico del metodo di Dunnett, quello di Wilcoxon e il metodo di Kruskal-Wallis, che a sua volta dovrebbe essere utilizzato in sostituzione del "test" di Tukey.
Se sono stati osservati dei decessi tra gli organismi esposti al campione è possibile confrontare la mortalità degli organismi trattati con quella degli organismi di controllo e, compatibilmente con i criteri di validità del saggio, stabilire se il campione saggiato sia responsabile di effetti letali significativi. A tal fine si applica il "test" di Fisher che permette di verificare, come spesso nei test statistici, un'ipotesi nulla e cioè che la percentuale di organismi sopravvissuti nei gruppi posti a confronto non differisca significativamente. Si possono utilizzare anche altri metodi tra i quali, ancora, il "test" di Dunnett, previa tuttavia la necessaria trasformazione delle percentuali di sopravvivenza nei corrispondenti valori di arcoseno. Se i dati lo permettono e vi è interesse ad esprimere la tossicità come concentrazione letale per una percentuale definita di organismi (LC_{50}, LC_{20}, ecc.), si applicheranno gli stessi metodi (es. "probit") già descritti per i saggi di tossicità acuta.
È da segnalare, infine, il crescente interesse per la possibilità di esprimere anche la tossicità subletale di un campione in termini di concentrazione capace di effetti definiti. In altre parole è interessante poter stimare quale concentrazione di campione possa inibire l'accrescimento o la riproduzione, ad esempio, del 20% rispetto al valore di controllo (EC_{20}). Se per i dati di mortalità, tipicamente qualitativi, l'uso di metodi destinati a questo tipo di stime è ampiamente consolidato (es. "probit"), per i dati di tipo continuo quali, ad esempio, il numero di neonati prodotti o la lunghezza corporea, l'analisi dei risultati termina generalmente con l'individuazione della NOEC e della LOEC e con il calcolo del "chronic value", noto in precedenza, ma meno correttamente, come massima concentrazione accettabile (MATC).
Questo tipo di risultati è dipendente dalla sequenza di concentrazioni saggiate, dal rapporto di diluizione prescelto, dalla variabilità dei risultati e quindi dalla qualità del lavoro sperimentale, ed inoltre, non è possibile associarvi stime di precisione o limiti fiduciali. Al contrario, esprimere la tossicità cronica come EC_{20}, o qualsiasi altra concentrazione di efficacia definita, permetterebbe di superare questi limiti ed offrirebbe alcuni innegabili vantaggi. Per esprimere la tossicità in questo modo, è necessario individuare la relazione esistente tra le concentrazioni di campione e le risposte del parametro indagato e ciò è possibile applicando dei metodi di regressione che sono solitamente parametrici ma, con opportuni aggiustamenti, è possibile usare anche procedure non parametriche. L'equazione di una curva logaritmica ha spesso dimostrato di poter descrivere in modo adeguato l'andamento delle risposte subletali (lunghezza, peso, riproduzione, ecc.) al crescere della concentrazione.

9000 - INDICATORI BIOLOGICI

Questa parte del manuale riporta la descrizione dei protocolli analitici per la determinazione di IBE, clorofilla, ATP e conta microbica.

L'Indice Biotico Esteso (IBE) si basa sull'analisi delle comunità di macroinvertebrati che colonizzano gli ecosistemi fluviali. Tali comunità che vivono associate al substrato sono composte da popolazioni caratterizzate da differenti livelli di sensibilità alle modificazioni ambientali e con differenti ruoli ecologici. Poichè i macroinvertebrati hanno cicli vitali relativamente lunghi, l'indice fornisce un'informazione integrata nel tempo sugli effetti causati da differenti cause di turbativa (fisiche, chimiche e biologiche). Nel monitoraggio di qualità delle acque correnti esso deve quindi considerarsi un metodo complementare al controllo chimico e fisico delle acque. Il D.Lgs. 152/99 dà ampio rilievo all'utilizzo dell'IBE nel monitoraggio e classificazione dei corpi idrici. Infatti stabilisce che lo stato ecologico venga definito incrociando i dati ricavati dalle misure dell'IBE con il livello di inquinamento espresso da alcuni parametri chimici, chimico-fisici e microbiologici (macrodescrittori); inoltre l'IBE viene indicato come indice biologico di qualità nell'allegato 2 del decreto, riguardante criteri generali e metodologie per il rilevamento delle caratteristiche qualitative delle acque superficiali idonee alla vita dei pesci salmonicoli e ciprinicoli.

Clorofilla ed ATP rappresentano invece indicatori di biomassa della componente planctonica. Negli ecosistemi acquatici tale stima è ampiamente utilizzata unitamente ai parametri fisico-chimici, nelle valutazioni quali-quantitative e previsionali della qualità e del livello trofico dei corpi idrici. La clorofilla consente di stimare la biomassa riferita ai soli organismi autotrofi, mentre l'adenosintrifosfato (ATP) fornisce una stima della biomassa totale che include anche gli organismi a metabolismo eterotrofo. Nel D.Lgs. 152/99 la clorofilla "a" risulta tra i parametri utilizzati (macrodescrittori) per valutare lo stato trofico ai fini di una prima classificazione dello stato ecologico di un lago ed elemento indispensabile per il calcolo dell'indice trofico, il cui valore numerico definisce lo stato ambientale (elevato, buono, mediocre, scadente) delle acque marine costiere.

La conta diretta dell'abbondanza microbica, tramite tecnica di microscopia ad epifluorescenza, consente invece di stimare la biomassa della componente batterica del plancton. Il batterioplancton è riconosciuto come un importante costituente degli ambienti acquatici e stimarne la biomassa è indispensabile in indagini sul flusso del carbonio e dei nutrienti e nell'elaborazione dei relativi modelli.

9010. Indice biotico esteso (I.B.E.)

1. Generalità del metodo

1.1 Finalità

Consente di formulare diagnosi della qualità degli ambienti di acque correnti sulla base delle modificazioni prodotte nella composizione delle comunità di macroinvertebrati a causa di fattori di inquinamento o di significative alterazioni fisiche dell'ambiente fluviale.

1.2 Origine

Derivato dal "Trent Biotic Index", rielaborato come "Extended Biotic Index – E.B.I." e adattato per una applicazione ai corsi d'acqua italiani.

1.3 Procedura di applicazione dell'Indice

La peculiarità del metodo e la complessità della procedura di applicazione rendono difficile una sua presentazione in forma schematica. Per una corretta applicazione occorre perciò integrare queste indicazioni con i contenuti del "Manuale di Applicazione – Indice Biotico Esteso (I.B.E.): I macroinvertebrati nel controllo di qualità degli ambienti di acque correnti" di Pier Francesco Ghetti edito da Provincia Autonoma e Agenzia Provinciale per la Protezione dell'Ambiente di Trento e con le guide per la classificazione dei macroinvertebrati dei corsi d'acqua italiani.

1.4 Comunità da analizzare

L'I.B.E. si basa sull'analisi di un gruppo di organismi animali invertebrati, comunemente definiti "macroinvertebrati", che colonizzano tutte le differenti tipologie dei corsi d'acqua. I "taxa" presi in considerazione dal metodo e il livello di determinazione tassonomica richiesto sono definiti in Tab.1.

1.5 Caratteristiche dell'indice

L'I.B.E. è particolarmente adatto a rilevare gli effetti prodotti nel tempo dal complesso dei fattori di alterazione dell'ambiente fluviale. Questo perché i macroinvertebrati delle acque correnti sono legati ai substrati, sono composti da numerose popolazioni con differenti livelli di sensibilità alle modificazioni ambientali, esercitano differenti ruoli ecologici e presentano cicli vitali relativamente lunghi.
L'indice è quindi in grado di rilevare lo stato di qualità del tratto di corso d'acqua analizzato integrando nel tempo gli effetti di differenti cause di alterazione dell'ambiente (fisiche, chimiche, biologiche). L'I.B.E. è quindi dotato di una elevata capacità di "integrazione dei segnali".
Per contro esso non consente di individuare l'azione dei singoli fattori che hanno indotto queste modificazioni né di quantificarne la rilevanza. Questo indice possiede quindi una bassa capacità "analitica".
Esso segnala uno stato complessivo di "qualità ecologica" del corso d'acqua e, solo indirettamente, la "qualità chimica e fisica" delle acque e dei sedimenti. Nel monitoraggio di qualità esso va quindi considerato un metodo "complementare" al controllo chimico, fisico e igie-

nico sanitario delle acque, in particolare per la definizione della qualità delle acque in relazione agli usi civili, agricoli, industriali e per la balneazione. L'I.B.E. assume invece un ruolo "centrale" nella definizione della "qualità ecologica" dei corsi d'acqua.
Per le sue caratteristiche esso si è dimostrato efficace nelle diagnosi preliminari di qualità di interi reticoli idrografici, per il controllo nel tempo dell'evoluzione di questa qualità, per stimare l'impatto prodotto da scarichi inquinanti puntiformi e diffusi, continui e accidentali, per valutare l'impatto di trasformazioni fisiche del corpo idrico, nella predisposizione di carte ittiche, per valutare le capacità autodepurative di un corso d'acqua. Nel Decreto Legislativo 152/99 è stato inserito tra le analisi di base, e quindi obbligatorio, per il monitoraggio dei corsi d'acqua.

1.6 Principi generali su cui si fonda il calcolo del valore di indice

I valori decrescenti dell'indice vanno intesi come un progressivo allontanamento dalla condizione "ottimale o attesa", definita sulla base di una struttura della comunità che in condizioni di naturalità o comunque di "buona efficienza dell'ecosistema" dovrebbe colonizzare quella determinata tipologia fluviale. La struttura della comunità "ottimale o attesa" è ovviamente diversa a seconda della tipologia fluviale considerata. Tuttavia le principali biotipologie di riferimento, al livello tassonomico richiesto dall'indice, si possono ricondurre a pochi modelli generali.
Quindi la condizione necessaria per una corretta applicazione dell'indice è la possibilità e la capacità di ricostruire, mediante idonee tecniche di campionamento dei macroinvertebrati, la composizione "attesa" (ovvero quella che si insedierebbe in condizioni di naturalità). Di conseguenza, quando non sussistono queste condizioni, il metodo non può essere applicato.
Altre condizioni essenziali per una corretta applicazione sono: la procedura sistematica di separazione degli organismi dal substrato, la competenza nel classificare i vari "taxa", un'adeguata capacità critica nella formulazione delle diagnosi, acquisita mediante corsi di formazione teorico-pratica e successive esperienze guidate.
Concettualmente il metodo si fonda quindi sul confronto e la valutazione delle differenze fra la composizione di una comunità "ottimale o attesa" e la composizione della comunità "campionata" in un determinato tratto di fiume.
Per le esigenze proprie di un indice (praticità, generalizzabilità, riproducibilità) il metodo prevede l'ausilio di una tabella a due entrate (Tab. 2). Questa tabella rappresenta una "guida" che serve per trasformare le informazioni racchiuse nelle liste dei "taxa" in un giudizio espresso mediante un valore di indice (Indice Biotico). In questo modo è possibile trasformare, seguendo una procedura uniforme, una informazione specialistica in una scala di valori di indice comprensibile universalmente.
Il giudizio di qualità è fondato su due tipi di indicatori: la presenza nel campione di "taxa" a differenti livelli di sensibilità alle alterazioni del corso d'acqua e la ricchezza totale della comunità.
La tabella è stata tarata per consentire una definizione comparabile dei valori di indice su differenti tipologie di acque correnti. In ogni tipologia fluviale analizzata la scala dei valori dell'indice è in grado di rilevare in modo armonico i successivi livelli dello stato di qualità, da una condizione "ottimale" ad una condizione di "massimo degrado".
La struttura di questa tabella riflette la necessità, propria di un indice pratico, di contemperare le esigenze di una applicazione del metodo su larga scala e adottare procedure uniformi e comparabili su tutto il territorio nazionale con quelle della sensibilità della scala dei valori dell'indice.
La procedura prevede alcuni accorgimenti che servono a ridurre l'effetto dei possibili errori ricorrenti nel calcolo dell'indice (es. determinazione tassonomica a livelli superiori alla specie, ampi intervalli nel numero totale di Unità Sistematiche campionate). Per contro non è consentito utilizzare questo indice per discriminare differenze di valori di giudizio che si collochino entro l'intervallo dell'errore ricorrente del metodo. In questo caso sarà necessario ricorrere ad altri metodi di indagine con maggiore potere discriminante e più mirati al problema specifico (es. analisi quantitativa della comunità, controllo di parametri indicatori dello stato trofico, saggi di tossicità, ecc.).
Il valore di indice, espresso per convenzione con un numero intero entro una scala discreta,

riassume quindi un giudizio di qualità basato sulla modificazione qualitativa della comunità campionata, rispetto ad una comunità di riferimento. Questo valore non può quindi essere considerato alla stregua del dato risultante da una misura fisica (es. grado centigrado) e chimica (es. mg/L).
Il gruppo dei macroinvertebrati è stato preferito ad altri gruppi sistematici, perché sono rappresentati da numerosi taxa con differenti livelli di sensibilità alle alterazioni dell'ambiente, sono adeguatamente campionabili, riconoscibili, classificabili, presentano cicli vitali mediamente lunghi, sono legati al substrato e quindi rappresentativi di una determinata sezione di un corso d'acqua.

Tabella 1: Limiti obbligati per la definizione delle unità sistematiche (U.S.) di macroinvertebrati

Gruppi Faunistici	Livelli di determinazione tassonomica per definire le "Unità Sistematiche"
Plecotteri	genere
Efemerotteri	genere
Tricotteri	famiglia
Coleotteri	famiglia
Odonati	genere
Ditteri	famiglia
Eterotteri	famiglia
Crostacei	famiglia
Gasteropodi	famiglia
Bivalvi	famiglia
Tricladi	genere
Irudinei	genere
Oligocheti	famiglia
Altri taxa da considerare nel calcolo dell'I.B.E.	
Sialidae (Megalotteri)	
Osmylidae (Planipenni)	
Prostoma (Nemertini)	
Gordiidae (Nematomorfi)	

1.7 Ambienti in cui è possibile applicare l'indice

L'I.B.E. può essere applicato a tutti i corsi d'acqua che sono stabilmente colonizzati e in cui il valore di indice "ottimale o atteso" risulti maggiore o uguale a 10 (Tab. 2, 4). Esistono infatti alcuni ambienti di acque correnti in cui questo valore può essere "naturalmente" inferiore a 10: tratti prossimi a sorgenti, acque di nevaio, tratti di foce dove si verifica risalita del cuneo salino. Il monitoraggio biologico inoltre non può essere eseguito nel periodo immediatamente successivo ad una asciutta o a una forte piena, in quanto la comunità risente di una incompleta ricolonizzazione. I tempi di ricolonizzazione variano da stagione a stagione e secondo l'intensità e la durata della piena o dell'asciutta.
La capacità di valutare lo stato di colonizzazione di un tratto di fiume deve far parte del bagaglio di conoscenze idrobiologico-ecologiche dell'operatore. Questo aspetto assume, ad esempio, una particolare rilevanza per le fiumare del Sud Italia e delle Isole.
I tratti di pianura dei grandi fiumi e i grandi canali artificiali sono a volte difficilmente campionabili in modo corretto, per l'altezza dell'acqua, la dispersione su ampi spazi dei microhabitat, le differenze di qualità fra sponda e sponda. In questi casi una corretta applicazione dell'indice è legata alla possibilità di dimostrare che il campionamento è stato eseguito con tecniche e in condizioni ambientali idonee e che è noto il valore di indice "ottimale o atteso", definito sullo stesso ambiente o in tipologie analoghe.
Il campionamento per il calcolo dell'indice non deve essere eseguito immediatamente a valle dell'immissione di uno scarico o di un affluente, ma deve essere rispettata una distanza tale

da garantire il completo rimescolamento delle acque con quelle del corpo ricevente. Lo scopo è infatti quello di valutare la qualità del corpo recettore e non dello scarico.

Tabella 2: Tabella per il calcolo del valore di I.B.E.

Gruppi faunistici che determinano con la loro presenza l'ingresso orizzontale in tabella (ingresso orizzontale)		Numero totale delle Unità Sistematiche costituenti la comunità (ingresso verticale)								
		0-1	2-5	6-10	11-15	16-20	21-25	26-30	31-35	36-..
Plecotteri presenti	Più di una U.S.	-	-	8	9	10	11	12	13*	14*
(*Leuctra* °)	Una sola U.S	-	-	7	8	9	10	11	12	13*
Efemerotteri presenti °°	Più di una U.S.	-	-	7	8	9	10	11	12	-
(Escludere Baetidae e Caenidae)	Una sola U.S.	-	-	6	7	8	9	10	11	-
Tricotteri presenti	Più di una U.S.	-	5	6	7	8	9	10	11	-
(Comprendere Baetidae e Caenidae)	Una sola U.S.	-	4	5	6	7	8	9	10	-
Gammaridi e/o Atiidi e/o Palemonidi presenti	Tutte le U.S. sopra assenti	-	4	5	6	7	8	9	10	-
Asellidi e/o Nifargidi presenti	Tutte le U.S. sopra assenti	-	3	4	5	6	7	8	9	-
Oligocheti o Chironomidi	Tutte le U.S. sopra assenti	1	2	3	4	5	-	-	-	-
Altri organismi	Tutte le U.S. sopra assenti	0	1-	2-	3-	-	-	-	-	-

Legenda:

°: nelle comunità in cui Leuctra è presente come unico "taxon" di Plecotteri e sono assenti gli Efemerotteri (tranne eventualmente generi delle famiglie di Baetidae e Caenidae), Leuctra deve essere considerata al livello dei Tricotteri per definire l'entrata orizzontale in tabella;

°°: per la definizione dell'ingresso orizzontale in tabella ogni genere delle famiglie Baetidae e Caenidae va considerato a livello dei Tricotteri;

-: giudizio dubbio, per errore di campionamento, per presenza di organismi di "drift" erroneamente considerati nel computo, per ambiente non colonizzato adeguatamente, per tipologia non valutabile con l'I.B.E. (es. sorgenti, acque di scioglimento di nevai, acque ferme, zone deltizie, salmastre);

**: questi valori di indice vengono raggiunti raramente negli ecosistermi di acqua corrente italiani per cui occorre prestare attenzione, sia nell'evitare la somma di biotipologie (incremento artificioso del numero di "taxa"), che nel valutare eventuali effetti prodotti dall'inquinamento, trattandosi di ambienti con elevata ricchezza in "taxa".*

1.8 Attività di campo

Il campionamento della comunità di macroinvertebrati che colonizza la sezione del corso d'acqua studiato va effettuato tenendo conto dei "microhabitat" rappresentativi della tipologia fluviale, possibilmente lungo un transetto da sponda a sponda ed occorre evitare il campionamento di differenti biotipologie lungo la sezione del corso d'acqua, perchè potrebbe aumentare artificiosamente il valore di Indice.
Come strumento di campionamento viene utilizzato il retino immanicato con rete a 21 maglie/cm (altre tecniche di campionamento possono essere adottate in particolari condizioni). La separazione in vivo degli organismi dal detrito e una prima classificazione degli organismi al fine di esprimere un giudizio preliminare di qualità devono essere effettuati sul posto. Solo in queste condizioni è possibile pervenire ad una valutazione affidabile e che può essere immediatamente controllata con ulteriori campionamenti.
Una corretta analisi delle comunità di macroinvertebrati è essenziale ma non esaurisce il quadro degli indicatori da prendere in considerazione per arrivare ad una diagnosi attendibile. Un'adeguata lettura dei principali caratteri dell'ambiente costituisce un corollario utile per capire i possibili fattori di alterazione dell'ambiente e per fornire all'operatore un'adeguata casistica e la capacità di associare differenti indicatori. Per leggere l'ambiente secondo criteri il più possibile oggettivi è opportuno adottare una scheda di campo che guidi nella registra-

zione dei vari caratteri (Tab. 3). Questi dati, registrando lo stato di fatto di un particolare ambiente ad un determinato tempo, assumono anche un importante valore documentario.
La struttura di questa scheda e il suo dettaglio potranno variare in relazione agli scopi dell'indagine. Si potrà così passare dalla scheda base, utilizzabile per indagini di monitoraggio su larga scala, ad una scheda di maggiore dettaglio per indagini specifiche (es. studi di impatto ambientale, carte ittiche, monitoraggio di aree protette, ecc.). Alla scheda dovranno essere allegati i metodi con cui vengono rilevati i vari caratteri ambientali in modo che il dato registrato possa essere interpretato correttamente anche da operatori diversi.

1.9 Attività di laboratorio

L'applicazione dell'I.B.E. richiede una fase preliminare di studio dell'ambiente e di organizzazione delle campagne di campionamento. Richiede inoltre una fase successiva di controllo in laboratorio delle comunità campionate, di verifica delle diagnosi formulate in campo, di organizzazione, registrazione ed elaborazione delle informazioni raccolte. I criteri e le procedure da seguire possono variare leggermente a seconda delle peculiarità degli ambienti studiati e delle differenti finalità dell'indagine.

1.10 Competenze degli operatori

L'applicazione dell'I.B.E. per la sorveglianza ecologica dei corsi d'acqua richiede un'adeguata formazione degli operatori in campo ecologico, idrobiologico e tassonomico, oltre ad un periodo di formazione specifica sotto la guida di personale qualificato.

2. La tabella a due entrate per il calcolo dei valori di I.B.E. e le relative classi di qualità

La definizione del valore di indice da assegnare ad una determinata sezione di un corso d'acqua si basa su di una tabella a due entrate (Tab. 2).
In ordinata sono riportati alcuni gruppi di macroinvertebrati che, dall'alto verso il basso, riflettono una sempre minore sensibilità agli effetti di alterazione della qualità dell'ambiente. In ascissa sono riportati degli intervalli numerici che fanno riferimento al numero totale di Unità Sistematiche ("taxa" al livello di classificazione previsto in Tab. 1) rinvenute nella stazione di campionamento.
Il metodo tiene conto del fatto che, non essendo possibile in una indagine con finalità pratiche classificare gli organismi di queste comunità a livello di specie, è stato definito un livello superiore di classificazione (famiglia o genere). Il calcolo dell'I.B.E. richiede quindi che vengano rispettati rigorosamente questi limiti di definizione tassonomica per i vari gruppi, altrimenti la "ricchezza in taxa" delle comunità potrebbe variare a seconda del grado di approfondimento della classificazione dei vari gruppi.
Il totale delle "Unità Sistematiche" rinvenute in una determinata stazione determina la "ricchezza in U.S. o taxa" della stessa.

Tabella 3: Scheda di rilevamento e registrazione dei dati di campo

LOCALIZZAZIONE DELLA STAZIONE

Ambiente.....Stazione.....Coord. UTM…….....
Codice.....
Quota s.m.....m Regione.....…....Provincia.....Comune……
Lungh. del corso d'acqua.....km Distanza dalla sorgente.....km Superficie bacino idrogr.....km^2
Corpi idrici recettori.....

RILEVAMENTO DELLE CARATTERISTICHE AMBIENTALI

Data ..... Ora..... Condizioni meteo.....

FOTOGRAFIA O DISEGNO DELLA SEZIONE CAMPIONATA CON RELATIVE QUOTE STIMATE

DISEGNO IN PIANTA DELL'ALVEO BAGNATO CON SITO DI CAMPIONAMENTO ED EMERGENZE AMBIENTALI
(N. Tavoletta IGM…….Quadrante…….Orientamento……..)

segue

segue tabella 3

Granulometria substrati nell'alveo bagnato (ordine di prevalenza): roccia.....
massi..... ciottoli..... ghiaia..... sabbia..... limo.....

Manufatti artificiali: fondo.....
Sponda dx.....
Sponda sx.....

Ritenzione detrito organico: • sostenuta • moderata • scarsa

Decomposizione materia organica. Prevalenza di: • strutture grossolane • frammenti fibrosi • frammenti polposi

Presenza di anaerobiosi sul fondo: • assente • tracce • sensibile localizzata • estesa

Organismi incrostanti: • feltro rilevabile solo al tatto • alghe crostose
• feltro sottile • feltro spesso, anche con pseudofilamenti incoerenti • alghe filamentose

Batteri filamentosi: • assenti • scarsi • diffusi

Vegetazione acquatica:.....
..... **Copertura alveo**.....%

Vegetazione riparia.....
.....

Larghezza dell'alveo bagnato (.....m) **rispetto all'alveo di piena** (.....m):
• 0-1% • 1-10% • 10-20% • 20-30% • 30-40% • 40-50%
• 50-60% • 60-70% • 70-80% • 90-100%

Velocità media della corrente: • impercettibile o molto lenta • lenta
• media e laminare • media e con limitata turbolenza • elevata e quasi laminare
• elevata e turbolenta • molto elevata e turbolenta

h media dell'acqua: .....cm **h max dell'acqua:**.....cm

Caratteri dell'ambiente naturale e costruito circostante:
in dx idrografica. .....
.....
in sx idrografica: .....
.....

segue

segue tabella 3

Organismi		pres.	abb.		pres.	abb.
Plecotteri (genere)						
Efemerotteri (genere)						
Tricotteri (famiglia)						
Coleotteri (famiglia)						
Odonati (genere)						
Ditteri (famiglia)						
Eterotteri (famiglia)						
Crostacei (famiglia)						
Gasteropodi (famiglia)						
Bivalvi (famiglia)						

segue

segue tabella 3

Organismi		pres.	abb.		pres.	abb.
Tricladi (genere)						
Irudinei (genere)						
Oligocheti (famiglia)						
Altri (famiglia)						
Totale U.S.						

VALORE DI I.B.E. (in campo)..... (in laboratorio).....Classe di Qualità.....
Giudizio.....
.....

Note.....
.....
.....

Responsabile dell'analisi e qualifica .....

La tabella dell'I.B.E. presenta quindi:

- una entrata orizzontale (primo ingresso in tabella 2), che deve essere utilizzata in corrispondenza delle U.S. più sensibili presenti nella comunità della stazione in esame. Ad esempio se in una stazione si rinvengono 3 U.S. di Plecotteri (ritenute più sensibili), assieme ad altre U.S., si deve entrare alla prima riga orizzontale ("Plecotteri presenti"), al livello superiore ("più di una sola U.S."). Un secondo esempio: nella comunità non si rinvengono Plecotteri, e nemmeno Efemerotteri e Tricotteri, ma il "taxon" più sensibile presente è quello dei Gammaridi, si entra allora a livello della riga corrispondente a questi ultimi;
- una entrata verticale, che va utilizzata in corrispondenza della colonna che comprende il numero totale di U.S. che formano la comunità complessiva in esame. Se ad esempio le U.S. presenti sono complessivamente 9, si entra a livello della colonna con l'indicazione dell'intervallo 6-10.

Il valore di indice sarà definito dal numero indicato nella casella che si trova all'incrocio della riga di entrata orizzontale con la colonna di entrata verticale.
Particolare attenzione va posta all'entrata orizzontale, essendo quella che può determinare il maggior intervallo di errore. Per questo è necessario verificare in modo rigoroso attraverso il campionamento la reale presenza dei "taxa" più sensibili.

La procedura si avvale quindi di due tipi di indicatori: la diversa sensibilità di alcuni gruppi di organismi alle alterazioni della qualità dell'ambiente (ordinata) e l'effetto prodotto da questa alterazione sulla "ricchezza in U.S. o taxa" della comunità (ascissa).
Dal momento che i valori decrescenti di indice vanno intesi come una misura progressiva dell'allontanamento da una condizione "ottimale o attesa" è possibile che la scala dei valori di qualità, essendo discreta e non continua, tenda ad appiattire eccessivamente questi giudizi verso il valore superiore o inferiore. A volte il numero totale di unità sistematiche può trovarsi all'estremo inferiore o superiore degli intervalli stabiliti in tabella. Se ad esempio in una stazione troviamo 2 U.S. di Plecotteri e 16 U.S. complessive, il valore di I.B.E. dovrebbe essere 10; in un'altra stazione troviamo 2 U.S. di Plecotteri e 15 U.S. complessive e il valore dovrebbe essere 9. Appare tuttavia evidente che in questi due casi è una sola U.S. di ingresso verticale che condiziona il passaggio fra un valore di 10 ed un valore di 9. Quando ci si trova in casi analoghi, con un numero di U.S. agli estremi degli intervalli previsti in tabella 2, è necessario attribuire un valore intermedio di indice, che sarà 10-9 nel primo caso e 9-10 nel secondo. I valori intermedi di indice consentono di rappresentare in modo più obiettivo la progressività del processo di allontanamento dalla condizione "ottimale".

2.1 Dai valori di indice alle classi di qualità

In Tab. 4 i valori di I.B.E. sono stati raggruppati in 5 Classi di Qualità (C.Q.), ciascuna individuata da un numero romano.
Le 5 Classi di Qualità possono essere facilmente visualizzate in cartografia mediante colori convenzionali (nell'ordine: azzurro, verde, giallo, arancione e rosso) o altro simbolismo grafico (Tab. 4).I valori intermedi tra le classi vengono rappresentati mediante tratteggio formato dai colori corrispondenti alle due classi.

Tabella 4: Tabella di conversione dei valori di I.B.E. in classi di qualità, con relativo giudizio e colore per la rappresentazione in cartografia. I valori intermedi tra due classi vanno rappresentati mediante tratteggio con colori o retinature corrispondenti alle due classi

Classi di qualità	Valori di I.B.E.	Giudizio di qualità	Colore e/o retinatura relativi alla classe di qualità	
Classe I	10-11-12-...	Ambiente non alterato in modo sensibile	Azzurro	
Classe II	8-9	Ambiente con moderati sintomi di alterazione	Verde	
Classe III	6-7	Ambiente alterato	Giallo	
Classe IV	4-5	Ambiente molto alterato	Arancione	
Classe V	0-1-2-3	Ambiente fortemente degradato	Rosso	

3. Protocollo di applicazione

Il complesso delle procedure da seguire per l'applicazione dell'indice costituisce parte integrante del metodo e sono descritte in dettaglio e con esemplificazioni nel Manuale di Applicazione – Indice Biotico Esteso (I.B.E.): I macroinvertebrati nel controllo di qualità degli ambienti di acque correnti" di Pier Francesco Ghetti edito da Provincia Autonoma e Agenzia Provinciale per la Protezione dell'Ambiente di Trento.
In estrema sintesi le attività per l'applicazione dell'indice possono essere raggruppate in tre fasi:

- indagini preparatorie;
- attività di campo e compilazione della scheda di rilevamento;
- attività di laboratorio, compilazione e certificazione del verbale di analisi e della relazione a commento dei risultati e delle eventuali carte di qualità.

3.1 Adempimenti conseguenti alle procedure richieste dal D.Lgs. 152/99

Il Decreto Legislativo n.152/99 sulla Tutela delle acque, al fine della classificazione dello Stato Ecologico dei corsi d'acqua, prevede, per corpi idrici significativi, di effettuare 4 campagne di monitoraggio all'anno mediante I.B.E. che possono essere distribuite stagionalmente o in relazione agli specifici regimi idrologici. Viene inoltre richiesto di calcolare il valore medio di I.B.E. rilevato nei 4 campionamenti da inserire nella tabella di intersezione con il Livello di Inquinamento espresso dai Macrodescrittori (LIM). Si sottolineano a tale proposito le modalità di calcolo o di procedura nel caso siano stati rilevati in alcuni campionamenti valori intermedi di indice, o quando si deve convertire un valore medio decimale in un valore di indice.
Il Decreto prevede che per classi intermedie (es. 8/9 o 9/8) si esegua il seguente procedimento:

- per la classe 10-9 si attribuisce il valore 9,6; per quella 9-10 il valore 9,4; per 9-8 il valore 8,6; per 8-9 il valore 8,4; ed a seguire per gli altri valori;
- per ritrasformare la media in valori di I.B.E. si procederà in modo contrario, avendo cura di assegnare la classe più bassa nel caso di frazione di 0,5: esempio 8,5 = 8-9 , 6,5 = 6-7 ecc..

Per agevolare ed uniformare la procedura di calcolo si conviene, per analogia a quanto prescritto dal Decreto, di attenersi alle seguenti indicazioni:

- frazioni da 8,0 a 8,3 e da 8,7 a 9,0 corrispondono rispettivamente a IBE di 8 e 9;
- valori intermedi di I.B.E. 7-8 o 8-7 vanno ricondotti, per essere inseriti nella classificazione di Stato Ecologico, ai primitivi valori di sorgente 7 e 8.

Per le tabelle di transcodifica e di riconversione confronta Spaggiari e Franceschini, 2000.

3.2 Rappresentazione grafica dei dati

Avendo progettato in modo adeguato la distribuzione delle stazioni di campionamento lungo un intero reticolo idrografico è possibile realizzare delle mappe di qualità di interi reticoli idrografici utili per organizzare i piani di monitoraggio e per valutare nel tempo l'efficacia degli interventi di risanamento. In queste mappe di qualità è opportuno utilizzare uno spessore diverso del tratto colorato a seconda della gerarchia idrologica del corso d'acqua, sulla base dei dati di portata media annua, di lunghezza del corso d'acqua, di ampiezza del bacino idrografico. La realizzazione di una mappa di qualità continua di un intero reticolo idrografico presuppone che sia stato campionato un adeguato numero di stazioni lungo i vari corsi d'acqua e che vi sia una precisa e documentata conoscenza della distribuzione delle fonti di inquinamento su tutto il territorio. Pur essendo questa la forma di rappresentazione più efficace è possibile infatti commettere errori di giudizio nel tracciare il tratto colorato che congiunge una stazione con la successiva.
In alternativa occorre rappresentare esclusivamente e puntualmente la qualità di ogni singola stazione campionata utilizzando, ad esempio, dei ciclogrammi che consentono di rappresentare le classi di qualità con colori, simboli, numeri e anche di riportare le variazioni stagionali.

BIBLIOGRAFIA

ALBA-TERCEDOR J. et al. (2002): *"Caracterizaciòn de cuencas mediterraneas espan olas en base al indice espan ol SBMWP como paso previo al estabilicimiento del estado ecològico de sus cursos de agua"*. XI Congreso de la Associaciòn Espan olas de Limnologia y III Congreso Ibérico de Limnologia, Madrid 17-21 giugno.

CAMPAIOLI S., GHETTI P.F., MINELLI A. & RUFFO S. (1994): "*Manuale per il riconoscimento dei macroinvertebrati delle acque dolci italiane*" Provincia Autonoma di Trento, Museo di Storia Naturale di Trento.

CAMPAIOLI S., GHETTI P.F., MINELLI A. & RUFFO S. (1999): "*Manuale per il riconoscimento dei macroinvertebrati delle acque dolci italiane*", Vol. II, Provincia Autonoma di Trento, Museo di Storia Naturale di Trento.

CHANDLER J.R. (1970): "A biological approach to water quality management" *Water Pollut. Control,* **69**, 415-422.

DE PAUW N., GHETTI P.F., MANZINI P. & SPAGGIARI R. (1992): "Biological assessment methods for running waters". In: "*River water quality - Ecological assessment and control*". C.C.E, Bruxelles, 217-248.

GHETTI P.F. & BONAZZI G. (1980): "*Biological water assessment methods: Torrente Parma, Torrente Stirone e Fiume Po*", 3rd Technical Seminar, Final Report, Commission of the European Communities.

GHETTI P. F. & BONAZZI G. (1981): *"I macroinvertebrati nella sorveglianza ecologica dei corsi d'acqua*", Collana del Progetto Finalizzato "Promozione della Qualità dell'Ambiente", CNR AQ/1/127.

GHETTI P.F. (1986): "*I macroinvertebrati nell'analisi di qualità dei corsi d'acqua. Manuale di applicazione - Indice Biotico E.B.I. modificato*", Provincia Autonoma di Trento.

GHETTI P.F. (1993): "*Manuale per la difesa dei fiumi*", Editrice della Fondazione "Giovanni Agnelli", Torino.

GHETTI P.F. (1995): "Indice Biotico Esteso (I.B.E.)", *Notiziario dei Metodi Analitici IRSA*, luglio 1995, 1-24.

GHETTI P.F. (1997): "*Manuale di Applicazione: Indice Biotico Esteso - I macroinvertebrati nel controllo della qualità degli ambienti di acque correnti*", Provincia Autonoma di Trento, Servizio Protezione Ambiente.

HELLAWELL J.M. (1986): "*Biological surveillance of rivers*", Water Research Centre, Stevenage, England.

RUFFO S., ed. (1977-85): "*Guide per il riconoscimento delle specie animali delle acque interne italiane*", Collana del Progetto Finalizzato "Promozione della Qualità dell'Ambiente" CNR, Roma.

SANSONI G. (1988): "*Atlante per il riconoscimento dei macroinvertebrati dei corsi d'acqua italiani*", Provincia Autonoma di Trento, Centro Italiano Studi di Biologia Ambientale.

SPAGGIARI R. & FRANCESCHINI S. (2000) "Procedure di calcolo dello stato ecologico dei corsi d'acqua e di rappresentazione grafica delle informazioni". *Biologia Ambientale*, **14** (2), 1-6.

WOODIWISS F.S. (1964): "The biological system of stream classification used by the Trent River Board", *Chemistry and Industry*, **14**, 443-447.

WOODIWISS F.S. (1978): "*Comparative study of biological-ecological water quality assessment methods*", Second practical demonstration. Summary Report. Commission of the European Communities.

Allegato 1

Elenco dei macroinvertebrati delle acque correnti italiane con indicazioni sintetiche su ecologia, propensione al drift, sensibilità agli inquinanti

Legenda

In questo allegato sono riportati gli elenchi dei "taxa" di macroinvertebrati delle acque correnti italiane, da considerare nel calcolo dell'IBE, sulla base della revisione tassonomica più recente. (Campaioli et al., 1994; 1999). Per ciascun gruppo vengono indicati anche i "taxa" che, per le loro caratteristiche ecologiche, non vanno considerati nel calcolo dell'indice, ma che possono ritrovarsi nelle acque correnti.
Per i vari "taxa" si riportano alcune informazioni utili ai fini di una corretta analisi delle strutture di comunità. Esse sono indicate come segue:

- **(A)**: "Taxon" a respirazione aerea e la cui presenza può essere, in genere, indipendente dalla qualità dell'ambiente acquatico. Questi taxa non vanno conteggiati per il calcolo dell'IBE (tranne il caso di un ingresso in ultima riga della Tab. 2).
- **(A.M)**: "Taxon" a respirazione aerea, ma dipendente anche dalle condizioni complessive di qualità dell'ambiente acquatico. Vanno conteggiati per il calcolo dell'IBE.
- **R**: Adattamento alla corrente: R="taxon" tipicamente reofilo; L="taxon" tipicamente limnofilo; ( )= "taxon" secondariamente R o L.
- **M.N.**: Modo di Nutrizione prevalente: T=tagliuzzatori; A=collettori aspiratori; F=collettori filtratori; Fr=filtratori con rete; Ra=raschiatori; P=predatori; Pi=predatori succhiatori. ( ): Modo di nutrizione secondario.
  I tagliuzzatori si nutrono di elementi grossolani di materia organica (CPOM), quali foglie cadute, rametti, organismi morti (riducono i detriti in particelle fecali con diametro <1 mm).
  I collettori si nutrono di particelle organiche di dimensioni <1 mm (FPOM). Possono essere suddivisi in collettori aspiratori, che aspirano particolato organico deposto sul substrato di fondo, e in collettori filtratori che filtrano il particolato trasportato dalla corrente. Un caso particolare è costituito da alcuni Tricotteri che filtrano producendo reti con dimensioni di maglie variabili. Questi particolari filtratori (Fr) si nutrono mangiando la rete ed il suo contenuto (animali o vegetali) periodicamente o rimuovendo le particelle dalle maglie.
  I raschiatori si nutrono soprattutto di alghe e di altri organismi incrostanti i substrati duri.
  I predatori catturano e si nutrono di prede vive mediante apparati boccali specializzati.
  I predatori succhiatori succhiano i liquidi corporei di altri animali.
- **R.T.**: Ruolo Trofico prevalente: E=erbivori; D=detritivori; C=carnivori; ( ) = Ruolo Trofico secondario. Gli erbivori si nutrono di organismi autotrofi, i detritivori si nutrono di detrito vegetale od animale, mentre i carnivori si nutrono di altri animali. Per alcuni taxa è difficile definire un ruolo trofico preciso; in molti casi lo stesso "taxon" (o le sue diverse specie) svolge contemporaneamente diversi ruoli (es. D-C).
- **N.M.P.**: Numero minimo di presenze (DRIFT). Per ciascun "taxon" viene ripor-

tato il numero minimo di presenze nel materiale campionato necessario per poter considerare l'organismo catturato come appartenente in modo stabile alla comunità. Al di sotto di questo valore di presenze si ritiene che l'organismo catturato sia di drift e quindi solo occasionalmente e temporaneamente presente. In questo caso il "taxon" non viene conteggiato per il calcolo dell'indice. Questa indicazione ha solo un valore orientativo, dal momento che le abbondanze nel campione possono essere influenzate dall'intensità del drift in una fase particolare del ciclo vitale della specie, dal livello di trofia dell'ambiente, dalle modalità e dall'intensità di campionamento. Particolare attenzione va riservata ai "taxa" che definiscono l'ingresso orizzontale in Tab. 2 e la cui presenza stabile nella comunità deve essere sicura.

Nel calcolo dell'I.B.E. possono essere commessi errori anche sensibili di giudizio per una considerazione, nel calcolo dell'indice, di taxa di drift che vengono catturati anche se presenti solo occasionalmente (in particolare tenendo sommerso a lungo il retino in contro corrente).

Altri criteri per valutare se i taxa non appartengono alla comunità possono essere: effettuare sui substrati raccolte di conferma senza retino; valutare la congruità del "taxon" rispetto alla biotipologia e al resto della comunità campionata; considerare per ciascun "taxon" la propensione al drift rispetto alla tipologia ambientale, al periodo, alla presenza di affluenti a monte.

- **B.S.**: Biotic Score- Indice proposto da Chandler, 1970. Questa indicazione viene riportata solo allo scopo di fornire ulteriori informazioni per una valutazione sulla sensibilità dei vari taxa all'inquinamento. Altre informazioni possono essere tratte dalle liste sul valore saprobico dei vari taxa.
- **SBMWP**: Score Biological Monitoring Waters Pollution - Versione aggiornata (2002) del BMWP' di ALBA-TERCEDOR & SANCHEZ-ORTEGA, 1988: riportata a titolo di informazione supplementare sul significato indicatore dei diversi "*taxa*" di macroinvertebrati. Per alcuni gruppi (si vedano ad esempio gli Efemerotteri) il metodo spagnolo consente, rispetto a quello inglese, maggiore articolazione di giudizio ed una più ampia rispondenza ai connotati faunistici ed ecoregionali italiani: poichè il livello di determinazione previsto dal metodo spagnolo è la famiglia, il punteggio relativo viene attribuito indifferentemente a tutti i generi compresi nella medesima famiglia.

Plecotteri

Famiglia	Genere	Dimensioni (mm)	R	M.N.	R.T.	N° minimo di presenze[1]	B.S.	SBMWP
Capniidae	*Capnia*	5-9	R	T	D	4-6	84-98	10
	Capnioneura	3-5	R	T	D	4-6	84-98	10
	Capnopsis	5-7	R	T	P	4-6	84-98	10
Chloroperlidae	*Chloroperla*	6-8	R	P(T)	C(D)	2-3	90-100	10
	Siphonoperla	9-12	R	P	C	2-3		10
	Xanthoperla	5-7	R	P	C	2-3		10
Leuctridae	*Leuctra*	5-16	R(L)	T	D	6-8	84-98	10
	Tyrrhenoleuctra	6	R	T	D	6-8		10
Nemouridae	*Amphinemura*	4-7	R(L)	T	D	4-6	47-63	7
	Nemoura	5-10	R(L)	T	D	4-6	84-98	7
	Nemurella	5-10	R(L)	T	D	4-6	84-98	7
	Protonemura	5-11	R(L)	T	D	4-6	84-98	7
Perlidae	*Dinocras*	20-31	R	P	C	2-3	90-100	10
	Perla	12-33	R	P	C	2-3	90-100	10
Perlodidae	*Dictyogenus*	15-25	R	P	C	2-3	90-100	10
	Isogenus°	15-21	R	P	C	2-3	90-100	10
	Isoperla	10-16	R	P	C	2-4	90-100	10
	Perlodes	15-25	R	P	D	2-3	90-100	10
Taeniopterygidae	*Brachyptera*	8-13	R	Ra	E-D	4-6	90-100	10
	Rhabdiopteryx	8-13	R	Ra	E-D	4-6	90-100	10
	Taeniopteryx	9-12	L(R)	T	E-D	4-6	90-100	10

(1) considerare il valore più alto nel caso non siano presenti altri taxa di Plecotteri
° si ritiene estinta in Italia

Tricotteri

Famiglia	Dimensioni (mm)	R	M.N.	R.T.	N° minimo di presenze	B.S.	SBMWP
Beraeidae	4-10	L(R)	Ra(T)	E-D	2	75-94	10
Brachycentridae	6-12	R	Ra-T(F)	E-D	2	75-94	10
Ecnomidae	8	L	F	E-D	2	38-31	7
Glossosomatidae	5-8	R	Ra(P)	E(C-D)	2	75-94	8
Goeridae	6-12	R	Ra	E-D	2	75-94	10
Helicopsychidae	5-6	R	Ra	E	2	75-94	
Hydropsychidae	10-20	R(L)	Ra	C-E-D	6	38-31	5
Hydroptilidae	<5	L	Si(Ra)	E(D)	2	75-94	6
Lepidostomatidae	7-11	R	T	E-D	2	75-94	10
Leptoceridae	9-15	L(R)	Ra-T(P)	E-D-(C)	2	75-94	10
Limnephilidae	7-38	R	T(P)	D(E-C)	2	75-94	7
Odontoceridae	18	R	Ra-P	C-E(D)	2	75-94	10
Philopotamidae	6-22	R	Fr	D(E)	2	38-31	8
Phryganeidae	20-40	L	T(P)	D-E(C)	2	75-94	10
Polycentropodidae	10-25	R(L)	Fr	C(D-E)	2	38-31	7
Psychomyidae	4-11	R(L)	F	D-E	2	38-31	8
Rhyacophilidae	10-30	R	P	C	4	65-88	7
Sericostomatidae	12	R(L)	T(Ra)	T(R)	2	75-94	10
Thremmatidae	5,5	R	R	E	2	75-94	

Efemerotteri

Famiglia	Genere	Dimensioni (mm)	R	M.N.	R.T.	N° minimo di presenze[1]	B.S.	SBMWP
Ametropodidae	*Ametropus*	11-20	R(L)	Ra	D	3	79-97	
Baetidae	*Baetis*	6-12	R	A(Ra-P)	D-E(C)	8	44-52	4
	Centroptilum	8	R	A(Ra-P)	D-E(C)	6	79-97	4
	Cloeon	8-10	R(L)	A(Ra-P)	D-E(C)	6	79-97	4
	Pseudocentroptilum	8-10		A(Ra-P)	D-E(C)	6	79-97	4
	Procloeon	9	R(L)	A(Ra-P)	D-E(C)	6	79-97	4
Caenidae	*Brachycercus*	9		A	D	6		4
	Caenis	4-9	R-L	A	D	6	79-97	4
Ephemerellidae	*Ephemerella*	5-7	R(L)	A(Ra-P)	D(E-C)	6	79-97	7
	Torleya	9	R	A(Ra-P)	D(E-C)	6	79-97	7
Ephemeridae	*Ephemera*	20-30	R-L	A(P)	D(C)	3	79-97	10
Heptageniidae	*Ecdyonurus*	7-15	R	Ra-A	D-E	4-6	79-97	10
	Electrogena	<13	R	Ra-A	D-E	4-6	79-97	10
	Epeorus	11-14	R	Ra-A	D-E	4-6	79-97	10
	Heptagenia	9-12	R(L)	Ra-A	D-E	4-6	79-97	10
	Rhithrogena	6-9	R	Ra-A	D-E	4-6	79-97	10
Leptophlebiidae	*Choroterpes*	8	R(L)	A	D(E)	4-6	79-97	10
	Habroleptoides	7-11		A	D(E)	4-6	79-97	10
	Habrophlebia	7-8	R	A	D(E)	4-6	79-97	10
	Paraleptophlebia	8-12	L	A	D(E)	4-6	79-97	10
	Thraulus	9	L	A	D(E)	4-6	79-97	10
Oligoneuriidae	*Oligoneuriella*	15	R	Ra-A-T	D-E	4-6	79-97	5
Polymitarcidae	*Ephoron*	17	L(R)	A(P)	D(C)	3	79-97	5
Potamanthidae	*Potamanthus*	14	R	A(P)	D(C-E)	3	79-97	10
Siphlonuridae	*Siphlonurus*	16	L	F(P)	D(C-E)	3	79-97	10

(1) Considerare il valore più alto nel caso non siano presenti altri taxa di Efemerotteri

Coleotteri[1]

Famiglia	Dimensioni (mm)	R	M.N.	R.T.	N° minimo di presenze	B.S.	SBMWP
Chrysomelidae (A.M.)	5	L		E	2	51-72	4
Dryopidae (A.M. da adulti)	3-6	L(R)	T	E-D	2	51-72	5
Dytiscidae (A.M.)	1-50	L(R)	a = P l = Pi	C	2	51-72	3
Elmidae (A.M. da adulti)	1,2-8,3	R	A(Ra-T)	E	3	51-72	5
Eubriidae		R	Ra	E	2	51-72	
Gyrinidae (A.M. da adulti)	3-8	L(R)	a = P l = Pi	C	1	51-72	3
Haliplidae (A.M. da adulti)	2,2-4,3	L-R	T	E	3	51-72	4
Helodidae (A.M.)		L-R	A-T	E	2	51-72	3
Hydraenidae (A.M.)	<3	R-L	Ra	E	3	51-72	5
Hydrophilidae (A.M.)	1-48	L	a = T(P) l = Pi	a = E(D-C) l = C	2	51-72	3
Hydroscaphidae	1			E	2		
Hygrobiidae (A.M. da adulti)	8-11	L	P	C	1	51-72	3
Limnebiidae (A.M.)	0,6-3	R	Ra	E	2	51-72	

(1) Sono i soli insetti olometaboli che vivono negli ambienti acquatici sia in forma larvale che imaginale (alcune famiglie presentano un solo stadio acquatico)
a= adulti; l= larve

Altri "taxa" di Coleotteri che possono essere rinvenuti nei corsi d'acqua ma che vanno esclusi ai fini del calcolo dell'I.B.E.

Coleotteri (da non considerare nel calcolo dell'I.B.E.)		
Famiglia	Dimensioni (mm)	Note
Helophoridae	2,2-9	Respirazione aerea. Preferiscono le acque stagnanti. Le larve hanno abitudini ripicole
Hydrochidae	2,4-5	Gli adulti vivono nelle acque stagnanti; le larve sono terrestri
Spercheidae	7	Poco frequenti, vivono nelle acque stagnanti sul le radici delle idrofite.
Sphaeridiidae	3,5-5	Vivono nelle acque stagnanti

Odonati								
Famiglia	Genere	Dimensioni (mm)	R	M.N.	R.T.	N° minimo di presenze	B.S.	SBMWP
Aeschnidae	*Aeschna*	30-45	L	P	C	1		8
	Anax	55-60	L	P	C	1		8
	Boyeria	<40	L	P	C	1		8
	Brachytron	<40	L	P	C	1		8
Calopterygidae	*Calopteryx*	25-35	L(R)	P	C	1		8
Coenagrionidae	*Agrion-Coenagrion*	20-35	L	P	C	1		6
	Cercion	25	L	P	C	1		6
	Erythromma	25-35	L	P	C	1		6
	Ischnura	20-25	L	P	C	1		6
	Pyrrosoma	20	L	P	C	1		6
	Ceriagron	15-20	L	P	C	1		6
Cordulegasteridae	*Cordulegaster*	<45	L-R	P P	C	1		8
Corduliidae	*Cordulia*	20-25	L	P	C	1		8
	Oxygastra	20	L	P	C	1		8
	Somatochlora	15-25		P	C	1		8
Gomphidae	*Gomphus*	<30	L	P	C	1		8
	Onychogomphus	20-25	L	P	C	1		8
	Ophiogomphus	<30		P	C	1		8
	Paragomphus	<25	L	P	C	1		8
	Stylurus	<35		P	C	1		8
Lestidae	*Chalcolestes*	25-30		P	C	1		8
Libellulidae	*Brachythemis*	15-20		P	C	1		8
	Crocothemis	20	L	P	C	1		
	Ladoma	20-25		P	C	1		8
	Orthetrum	15-30	L	P	C	1		8
	Sympetrum	10-20	L	P	C	1		8
	Trithemis	20		P	C	1		8
Platycnemididae	*Platycnemis*	15-20	L	P	C	1		6

Altri "taxa" di Odonati che possono essere rinvenuti nei corsi d'acqua ma che vanno esclusi ai fini del calcolo dell'I.B.E.

Odonati (da non considerare nel calcolo dell'I.B.E.)

Famiglia	Genere	Dimensioni (mm)	Note
Aeschnidae	*Hemianax*	45	Colonizza acque temporanee (laghetti irrigui)
Coenagrionidae	*Enallagma*	20-25	Colonizza acque ferme in quota
Corduliidae	*Ephiteca*	<30	Colonizza acque ferme
Gomphidae	*Lyndenia*	45	Colonizza esclusivamente laghi grandi e poco profondi
Lestidae	*Lestes*	24-30	Colonizza laghi e pozze anche salmastri
	Sympecma	25	Colonizza acque ferme e tollera anche condizioni debolmente salmastre
Libellulidae	*Leucorrhinia*	20	Colonizza laghetti e torbiere acide
	Libellula	<25	Colonizza laghi e pozze con vegetazione
	Platetrum	25	Colonizza acque ferme anche artificiali e prive di vegetazione
	Selysiothemis	20	Colonizza acque ferme, con preferenza per grandi specchi d'acqua poco profondi
	Tarnetrum	15-20	Colonizza acque ferme anche temporanee e/o artificiali

Ditteri

Famiglia	Dimensioni (mm)	R	M.N.	R.T.	N° minimo di presenze	B.S.	SBMWP
Anthomyidae o Muscidae	8-17	R	Pi	C	2		4
Athericidae	16-30	R(L)	Pi	C	2		10
Blephariceridae	5-12	R	Ra	E	2		10
Ceratopogonidae	3-18	L	P(A-Ra)	C(D)	2		4
Chironomidae	3-30	L-R	P(A-Ra)	C(E-D)	8	28-4	3
Cylindrotomidae	25			E?	2		
Dixidae (A.M.)	8-13	R	F-Ra	D	2		4
Empididae	5-7	R	Pi	C	1		4
Ephydridae	6-13	L(R)	Ra(P)	E(D-C)	2		3
Limoniidae	6-15	R(L)	P(T)	C(E-D)	2	60-84	4
Psycodidae (AM)	6-15	L	Ra	D-E	2	19-1	4
Rhagionidae	<22		Pi	C(D)	1		4
Sciomyzidae	2-7	L	Pi	C	1		4
Simuliidae	4-12	R	F	E-D	8	56-75	10
Stratiomyidae (AM)	4-14	L	F	E-C	2	19-1	4
Tabanidae	10-20	R	Pi	C	2		4
Thaumaleidae	6-11				2		3
Tipulidae	6-40	L	T(P)	D(E-C)	2		10

Altri "taxa" di Ditteri che possono essere rinvenuti nei corsi d'acqua ma che vanno esclusi ai fini del calcolo dell'I.B.E.

Ditteri (da non considerare nel calcolo dell'I.B.E.)		
Famiglia	Dimensioni (mm)	Note
Chaoboridae	9-14	Larve e pupe vivono nelle acque dei laghi
Cordyluridae o Scatophagidae	8-14	La famiglia comprende specie terrestri e semiacquatiche che vivono nei terreni umidi degli ambienti ripari delle acque correnti e stagnanti
Culicidae	5-10	Larve a respirazione aerea; vivono in una varietà notevole di ambienti di acque ferme, assai di rado debolmente correnti
Dolichopodidae	9-15	Larve prevalentemente terrestri, raramente semiacquatiche degli ambienti di sedimenti umidi ripari
Ptychopteridae	15-20	Larve a respirazione aerea che colonizzano le acque calme e poco profonde di risorgive, stagni e paludi. Il rinvenimento in acque correnti è raro
Syrphidae	5-20	Larve a respirazione aerea terrestri e semiacquatiche. Costituiscono la fauna caratteristica di fosse settiche e liquami

Eterotteri[1]							
Famiglia	Dimensioni (mm)	R	M.N.	R.T.	N° minimo di presenze	B.S.	SBMWP
Aphelocheiridae (A.M.)	8,5-10	R	Pi	C	2		10
Corixidae (A.M.)	1,7-9,5		Ra - Pi	E-C	2	19-1	3
Naucoridae(A M)	8-16	L-R	Pi	C	2	19-1	3
Nepidae (A.M.)	14-35	L	Pi	C	2	19-1	3
Notonectidae (A.M.)	7-16	L	Pi	C	2	19-1	3

(1) Mentre i Gerromorfi hanno una tipica respirazione aerea e vivono sopra l'acqua sfruttando la tensione superficiale, i Nepomorfi hanno dei sistemi respiratori più complessi che variano da genere a genere e spesso tra forme giovanili e adulti (a volte con dipendenza sia dall'ossigeno atmosferico che da quello disciolto nelle acque).

Altri "taxa" di Eterotteri che possono essere rinvenuti nei corsi d'acqua ma che vanno esclusi ai fini del calcolo dell'I.B.E.

Eterotteri (da non considerare nel calcolo dell'I.B.E.)		
Famiglia	Dimensioni (mm)	Note
Gerridae	5,5-1,7	Colonizzano le rive dei fiumi e pattinano sulle acque ferme
Hebridae	1,6-2,3	Camminano sia sull'acqua che sul terreno. Prediligono le sponde sabbiose o ghiaiose di laghi e di paludi e di piccoli corsi d'acqua a lento deflusso
Hydrometridae	7,5-13	Vivono lungo le sponde di laghi, stagni, paludi e corsi d'acqua a lento corso
Mesoveliidae	3-3,5	Si muovono sull'acqua ma prediligono stare sulle foglie galleggianti delle ninfee e di altre piante acquatiche
Ochteridae	4-6	Vivono normalmente fuori dall'acqua e si immergono per la predazione
Pleidae	2,5-3	Colonizza le acque ferme e limpide
Veliidae	1,4-9,4	Vivono sull'acqua in prossimità delle rive. Prediligono acque calme purchè limpide

Crostacei							
Famiglia	Dimensioni (mm)	R	M.N.	R.T.	N° minimo di presenze	B.S.	SBMWP
Asellidae	<15	L	T	D	6	25-10	3
Astacidae*	<110	L-R	T(P)	D-E(C)	1		8
Atyidae	<40	L	T(P)	D-E(C)	4		6
Crangonyctidae			T	D			
Gammaridae	<15	R(L)	T	D	6	40-40	6
Niphargidae			T	D	4		
Palaemonidae	<45	L	T(P)	D(C)	4		
Potamidae	<200	L	T(P)	D(C)	1		

**comprende solo Astropotamobius pallipes italicus e Astacus astacus*

Altri "taxa" di Crostacei che possono essere rinvenuti nei corsi d'acqua ma che vanno esclusi ai fini del calcolo dell'I.B.E.

Crostacei (da non considerare nel calcolo dell'I.B.E.)		
Famiglia	Dimensioni (mm)	Note
Ostracoda	1-3	Abitatore di acque lacustri o molto lente (monte do briglie o sbarranenti)
Triopsidae	15-30	Abitatore di risaie e acque temporanee

Gasteropodi [1]							
Famiglia	Dimensioni[2] (mm)	R	M.N.	R.T.	N° minimo di presenze	B.S.	SBMWP
Acroloxidae	L:<6,5 W:<3,7	L	R	E-D	1	30-18	
Ancylidae	L:<4,7 W:3,9	R	R	E(D)	1	70-91	6
Bythiniidae	H:5-14 D:4-6,2	L(R)	T-R	D-E	1	30-18	3
Emmericiidae	H:5,6-8,8 D:4-6,2	L	R	E(D)	1		
Hydrobioidea	H:1,9-3,9	R(L)	R	E(D)	1	30-18	3
Lymnaeidae	L:6-70 W:4-30	L(R)	R-T(P)	E(C)	1	30-18	3
Neritidae	H:8 L:10-13	R	R	E	1	30-18	6
Physidae	L:8-17 W:3-10	L(R)	R(T)	E(D)	1	30-18	3
Planorbidae	H:0,2-15 D:4-19	L	R-T	E-D	1	30-18	3
Valvatidae	H:1-6 D:<5	L(R)	R-T	E-D	1	30-18	3
Viviparidae	L:<50 D:<25	L(R)	R-T	E-D	1	30-18	6

(1) Non vanno mai considerati i gusci vuoti nel calcolo dell'I.B.E.
(2) L= lunghezza; H: altezza; W= larghezza; D= diametro

Altri "taxa" di Gasteropodi che possono essere rinvenuti nei corsi d'acqua ma che vanno esclusi ai fini del calcolo dell'I.B.E.

Gasteropodi (da non considerare nel calcolo dell'I.B.E.)		
Famiglia	Dimensioni [2] (mm)	Note
Pyrgulidae	H:7,6-10 D:2,5-3,6	Comune nei laghi prealpini italiani dove vive nel fango, nella sabbia o fra la vegetazione di fondo

(2) L= lunghezza; W= larghezza; H= altezza; D= diametro

Bivalvi[1]							
Famiglia	Dimensioni[2] (mm)	R	M.N.	R.T.	N° minimo di presenze	B.S.	SBMWP
Dreissenidae	L:<28	L(R)	F	E-D	1	30-18	
Pisidiidae	L:<4 H:3-4	R-L	F	E-D	1	30-18	3
Sphaeriidae	L:<15 H:<11	L(R)	F	E-D	1	30-18	3
Unionidae	L:<200	L	F	E-D	1	30-18	3

(1) Non vanno mai considerati i gusci vuoti nel calcolo dell'I.B.E.
(2) L= lunghezza; H: altezza

Tricladi								
Famiglia	Genere	Dimensioni (mm)	R	M.N.	R.T.	N° minimo di presenze	B.S.	SBMWP
Dendrocoelidae	*Dendrocoelum*	15-25	R-L	Pi	C	1	35-25	5
Dugesiidae	*Dugesia*	20-35	L-R	Pi	C	1	35-25	5
Planariidae	*Crenobia*	7-15	R(L)	Pi	C	1	90-100	5
	Planaria	<15	L	Pi	C	1	35-25	5
	Phagocata	<15	L	Pi	C	1	35-25	5
	Polycelis	12-20	R-L	Pi	C	1	35-25	5

Irudinei								
Famiglia	Genere	Dimensioni (mm)	R	M.N.	R.T.	N° minimo di presenze	B.S.	SBMWP
Erpobdellidae	*Dina*	<80	L-R	P	C	1	24-8	3
	Erpobdella	<75	R-L	P	C	1	24-8	3
	Trocheta	75-150	L-R	P	C	1	24-8	3
Glossiphoniidae	*Batracobdella*	7-30	L-R		C	1	24-8	3
	Glossiphonia	10-30	L(R)	Pi	C	1	26-13	3
	Helobdella	5-10	L	Pi	C	1	24-8	3
Haemopidae	*Haemopis*	50-200	L	P	C	1	23-7	3
Piscicolidae	*Piscicola*	20-50	R(L)	PI	C	1	24-8	3

Altri "taxa" di Irudinei che possono essere rinvenuti nei corsi d'acqua ma che vanno esclusi ai fini del calcolo dell'I.B.E.

Irudinei (da non considerare nel calcolo dell'IBE)			
Famiglia	Genere	Dimensioni (mm)	Note
Glossiphoniidae	*Hemiclepsis*	<30	Si nutre di sangue di pesci, anfibi e tartarughe
	Placobdella	20-70	Legata alle tartarughe d'acqua e agli ambienti palustri
	Theromyzon	15-18	Ectoparassita di uccelli
Hirudinae	*Hirudo*	100-150	Frequenta stagni e paludi. Gli adulti si nutrono di sangue di vertebrati a sangue caldo
	Limnatis	100-150	Frequenta acque ferme anche temporanee
Piscicolidae	*Cystobranchus*	20-30	Ectoparassita di pesci

Oligocheti							
Famiglia	Dimensioni (mm)	R	M.N.	R.T.	N° minimo di presenze	B.S.	SBMWP
Enchytraeidae	<20-30	L(R)	A	D	1		1
Haplotaxidae	200-250	L	A	D	1		1
Lumbricidae e/o Criodrilidae	<300	L (R)	A	D	1		1
Lumbriculidae	10-40	R (L)	A	D	1		1
Naididae	<20-30	L (R)	A (P)	C (D-E)	1	20-2	1
Propappidae			A	D	1		1
Tubificidae	>20-30	L (R)	A	D (E)	1	22-9	1

Altri taxa che vanno considerati nel calcolo dell'I.B.E.							
Taxon	Dimensioni (mm)	R	M.N.	R.T.	N° minimo di presenze	B.S.	SBMWP
Sialidae (Megalotteri)	<26	L(R)	P	C	1	75-94	
Osmylidae (Planipenni)	<15	L(R)	P	C	1		4
Prostoma (Nemertini)	<20		P	C	1		
Gordiidae (Nematomorfi)	<160	R	Pi	C	1		

Altri "taxa" di microinvertebrati non indicati espressamente in queste tabelle non vanno considerati per il calcolo dell'I.B.E.

9020. Determinazione della clorofilla: metodo spettrofotometrico

Introduzione

In ambienti acquatici la misura della clorofilla *a* è utilizzata come indicatore di biomassa autotrofa in quanto rappresenta il pigmento indispensabile per il processo di fotosintesi per tutti gli organismi autotrofi. La clorofilla *a* costituisce l'1-2% del peso secco della sostanza organica delle alghe. Dalla misura della clorofilla è così possibile risalire al contenuto di sostanza organica utilizzando fattori di conversione. Il rapporto tra carbonio organico e clorofilla varia tra le specie, in funzione delle diverse condizioni fisiologiche ed ambientali; in ambienti marini tale rapporto è compreso nell'intervallo di valori 23-79. L'APHA propone un coefficiente unico pari a 67.
Le alghe planctoniche contengono altri pigmenti fotosintetici tra cui la clorofilla *b* e *c*. La stima di tali clorofille, diversamente distribuite tra i gruppi tassonomici, può essere utilizzata per identificare i vari gruppi algali presenti nel campione.
Tre metodi sono generalmente utilizzati per l'analisi della clorofilla: spettrofotometrico, fluorimetrico e cromatografico. I metodi spettrofotometrico e fluorimetrico sono largamente utilizzati per indagini di campo. La tecnica fluorimetrica, fino a 50 volte più sensibile di quella spettrofotometrica, consente l'utilizzo di volumi ridotti di campione e la misura della clorofilla *in vivo*. La tecnica cromatografica è ritenuta la più opportuna per identificare e quantificare accuratamente tutti i pigmenti fotosintetici.
I metodi ottici possono significativamente sovrastimare o sottostimare la concentrazione di clorofilla a causa della sovrapposizione delle bande di assorbimento o di fluorescenza di pigmenti diversi o di prodotti di degradazione. Ad esempio in campioni di profondità o provenienti da aree ad elevata trofia, i prodotti di degradazione della clorofilla, derivanti da cellule senescenti, detrito e materiale di origine fecale, rappresentano a volte una frazione significativa dei pigmenti autotrofi indicati con il termine generico di "feopigmenti". Tali prodotti possono essere misurati sia per spettrofotometria che per fluorimetria ma in quest'ultima tecnica la presenza di clorofilla *b* (posseduta dalle alghe verdi e largamente distribuita anche in acque oligotrofiche) interferisce sia con la stima della clorofilla *a* che dei feopigmenti.
Il metodo spettrofotometrico, descritto nel seguito, offre numerosi vantaggi in termini di semplicità, accuratezza, costo e tempo d'analisi, risultando particolarmente adatto ad essere impiegato in indagini di campo.

1. Principio del metodo

Il metodo si basa sulla proprietà della clorofilla di assorbire la luce nella zona del rosso dello spettro visibile. Dal campione concentrato su filtro la clorofilla è estratta in acetone e la concentrazione determinata tramite lettura dell'assorbanza. In presenza di prodotti di degradazione, la cui emissione interferisce con quella della clorofilla *a*, la stima dei pigmenti può essere effettuata più correttamente attraverso l'acidificazione dell'estratto. A pH acido la clorofilla *a* perde l'atomo di magnesio dal nucleo porfirinico e si converte con rapporto stechiometrico in feofitina *a*. L'uso di appropriate equazioni permette successivamente di calcolare algebricamente le concentrazioni nel campione sia della clorofilla *a* che della somma dei prodotti di degradazione spettralmente simili (feofitina *a* e feoforbide *a*) indicati da Lorenzen come "feopigmenti".

2. Campo di applicazione

Il metodo è valido per diverse tipologie di acque ed in particolare è raccomandato per acque ad elevata trofia e di profondità. L'intervallo di concentrazione misurabile è funzione delle condizioni sperimentali quali il volume di acqua filtrata e la sensibilità dello spettrofotometro utilizzato per cui non si ritiene opportuno specificare il campo di applicazione.

3. Interferenze e cause d'errore

I pigmenti fitoplanctonici sono biochimicamente reattivi e labili per cui i campioni dovrebbero essere analizzati immediatamente dopo il prelievo. In alternativa il campione concentrato su filtro può essere conservato per periodi limitati di tempo (vedi Capitolo 4).
La concentrazione del campione sul filtro deve essere effettuata con cura. Un'eccessiva depressione creata dalla pompa aspirante avrebbe come effetto la rottura delle cellule vegetali con il conseguente passaggio dei pigmenti attraverso il filtro.
La stabilità della clorofilla dipende in larga misura dalla luce, dalla temperatura e dal pH del mezzo, quindi particolare attenzione merita la manipolazione del campione e dell'estratto.
Una elevata presenza di organismi zooplanctonici di grandi dimensioni può rappresentare un problema per l'analisi dei pigmenti fotosintetici. La clorofilla contenuta nell'apparato digerente può infatti contribuire significativamente alla concentrazione finale. In questo caso si consiglia di prefiltrare il campione attraverso un retino con maglie da 200-250 µm.
La selezione della banda passante e delle lunghezze d'onda per le letture allo spettrofotometro è causa frequente d'errore e pertanto va effettuata con cura. Il picco di assorbimento della clorofilla è molto stretto e la banda passante ottimale è tra 0,5 e 2 nm. Una banda spettrale di 20 nm di larghezza, ad esempio, sottostimerebbe la concentrazione di clorofilla del 40%. È consigliabile inoltre verificare il picco di assorbimento della clorofilla, che varia a seconda della capacità risolutiva dello strumento, mediante scansione tra 600 ed 800 nm.
L'operazione di acidificazione dell'estratto deve essere effettuata con cautela. Concentrazioni di acido cloridrico superiori a $3 \cdot 10^{-3}$ M provocano interferenze nella lettura dei feopigmenti a causa della formazione di prodotti di degradazione dei carotenoidi.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campione di acqua può essere prelevato tramite le comuni bottiglie usate nella pratica oceanografica e limnologica. Si consiglia l'uso di bottiglie scure per la conservazione dei campioni poiché l'esposizione alla luce diretta del campione produce una degradazione fotochimica dei pigmenti. Il campione va conservato a +4°C e filtrato non oltre 8 ore dal prelievo. I filtri derivanti da campioni a pH 7 possono essere posti in un recipiente a tenuta, ripiegati (con le alghe all'interno) e avvolti in strati di carta assorbente. Conservare i filtri alla temperatura di –20°C per non oltre una settimana, o a –90°C fino a 60 giorni. I campioni derivanti da ambienti a pH acido devono essere filtrati e trattati subito per prevenire la degradazione dei pigmenti.

5. Apparecchiature

5.1 Normale attrezzatura di laboratorio

5.2 Accessori per filtrazione: pompa aspirante con manometro, beuta da vuoto, portafiltro e imbuto da filtrazione da 47 mm di diametro, pinze a molla per saldare l'imbuto alla base, pinzette a punte piatte per la manipolazione dei filtri.

5.3 Filtri in fibra di vetro (porosità nominale 0,7 µm; diametro 47 mm).

5.4 *Bottiglia* scura da reagente con dosatore da 10 mL.

5.5 *Pipette* da 0,1 e 5 mL.

5.6 *Sistema di omogeneizzazione* completo di "potter" in vetro Pyrex da 25 mL, pestello in teflon con scanalature all'estremità (per ulteriori dettagli vedi Fig. 1) e bagno di ghiaccio. È importante che lo spazio tra il pestello e la parete di vetro permetta il passaggio del filtro durante l'operazione di omogeneizzazione. L'omogeneizzazione può essere effettuata con un motore elettrico applicato al pestello.

5.7 *Provette* graduate da 15 mL con tappo a tenuta.

5.8 *Sistema di filtrazione monouso a siringa* resistente ai solventi, con supporto per filtri da 25 mm di diametro e membrane con porosità 1,0 µm.
In alternativa *centrifuga* per provette da 15 mL.

5.9 *Spettrofotometro* munito di celle da 1-4-10 cm di cammino ottico.

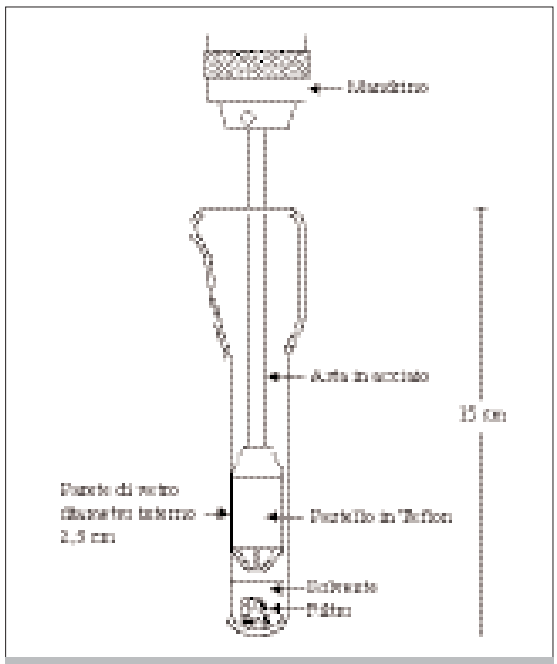


Figura 1: Apparato utilizzato per l'omogeneizzazione dei filtri.

6. Reattivi

6.1 *Soluzione acquosa di acetone al 90%*

Porre 100 mL di acqua deionizzata in un matraccio da un litro e portare a volume con acetone (CH_3COCH_3) di grado analitico. Conservare la soluzione nella bottiglia scura da reagente (5.4).

Nota: *si raccomanda particolare attenzione durante la manipolazione dell'acetone in quanto estremamente infiammabile ed irritante.*

6.2 *Soluzione acquosa di acido cloridrico 0,1 M*

7. Procedimento

7.1 *Preparazione del campione*

Condurre le operazioni a luce attenuata. Agitare il campione e filtrarne un volume idoneo utilizzando gli apparati (5.2) e (5.3). L'aspirazione deve esercitare una depressione non superiore ai 150 mm Hg. Registrare con esattezza il volume filtrato. Interrompere la filtrazione prima che il filtro si intasi.

7.2 *Estrazione*

Prosciugare il filtro per aspirazione, evitando l'essiccamento, ripiegarlo in due, tagliarlo in pic-

cole porzioni e porlo nell'apposito sistema di omogeneizzazione (5.6) in 5 mL della soluzione acquosa di acetone (6.1). Omogeneizzare per 1 minuto (a 500 giri per minuto nel caso si disponga di un motore) raffreddando nel ghiaccio l'estremità dell'omogenizzatore. Raccogliere l'omogenato in una provetta e lavare il pestello e il "potter" con due aliquote di soluzione acquosa di acetone (6.1). Dopo averle raccolte accuratamente aggiungerle all'omogenato e portare il volume finale a 10 mL. Evitare eccessive diluizioni dell'estratto. Conservare per 2 ore gli estratti a +4°C e al buio.
Procedere alla chiarificazione dell'estratto per filtrazione (5.8). Al fine di ridurre la ritenzione sul sistema di filtrazione forzare il passaggio di 2 mL di aria dopo il campione. In alternativa l'estratto può essere centrifugato per un tempo da stabilire in base al modello della centrifuga e al grado di chiarificazione raggiunto dall'estratto.
Versare l'estratto chiarificato in una provetta da 15 mL (5.7) e misurare il volume finale.

7.3 Misura dell'assorbanza

Azzerare lo strumento con la soluzione di acetone (6.1), utilizzando celle accoppiate otticamente e tappate, alle lunghezze d'onda di 750 nm, 664 nm e 665 nm. La scelta del percorso ottico delle cuvette va effettuata in funzione del grado di diluizione degli estratti. Leggere le assorbanze dell'estratto alle lunghezze d'onda di 750 nm e 664 nm contro la cella di riferimento riempita di soluzione acquosa di acetone. La lettura dell'estratto a 750 nm serve a misurarne la torbidità che, utilizzando una cuvetta di 10 cm di cammino ottico, deve essere inferiore a 0,05 unità di assorbanza.
Acidificare il campione aggiungendo direttamente nella cuvetta 30 µL della soluzione di acido cloridrico per ogni mL di estratto. Capovolgere più volte la cuvetta accuratamente tappata, attendere dai 3 ai 10 minuti per la degradazione a feofitina di tutta la clorofilla. Leggere, quando il valore di assorbanza si è stabilizzato, alle lunghezze d'onda di 750 nm e 665 nm. Le letture dell'estratto acidificato hanno valori di assorbanza inferiori alle corrispondenti del campione non acidificato ed il rapporto tra i picchi di assorbimento (664/665) varia da 1,0 (nel caso siano presenti solo prodotti di degradazione) a 1,7 (nel caso sia presente solo clorofilla). Prima di procedere alla lettura del campione successivo lavare accuratamente la cella con la soluzione di acetone (6.1) per eliminare ogni traccia di acido.

8. Calcoli

Calcolare le concentrazioni di clorofilla *a* e di feofitina *a* nel campione come segue:

Clorofilla *a* (mg/m^3) = {26,7 [(664 – 750) – (665a – 750a)] v}/V·L

Feofitina *a* (mg/m^3) = {26,7 [1,7 (665a – 750a) – (664 – 750)] v}/V·L

dove:

750 e 664 = assorbanze dell'estratto alle corrispettive lunghezze d'onda;
750a e 665a = assorbanze dell'estratto acidificato alle corrispettive lunghezze d'onda;
v = volume (mL) dell'estratto;
V = volume (L) d'acqua filtrata;
L = cammino ottico (cm) della cella.

8.1 Calcolo della clorofilla a in assenza di feopigmenti

Nel caso in cui la concentrazione dei prodotti di degradazione della clorofilla sia trascurabile, ad esempio in campioni provenienti da colture algali in fase di crescita logaritmica o in acque superficiali eufotiche, è possibile calcolare la concentrazione delle clorofille *a, b e c* (data come somma della clorofilla c_1 e c_2) usando lo stesso metodo di estrazione. La lettura delle assorbanze è effettuata solo sull'estratto non acidificato alle lunghezze d'onda di 750

nm, 664 nm, 647 nm e 630 nm. Per il calcolo delle clorofille estratte in acetone al 90% sono disponibili equazioni che, avvalendosi di appropriati coefficienti di estinzione, permettono una elevata accuratezza. Quindi:

Clorofilla *a* (mg/m^3) = {[11,85 (664 – 750) – 1,54 (647 – 750) – 0,08 (630 – 750)] v}/V·L

Clorofilla *b* (mg/m^3) = {[21,03 (647 – 750) – 5,43 (664 – 750) – 2,66 (630 – 750)] v}/V·L

Clorofilla *c* (mg/m^3) = {[24,52 (630 – 750) – 7,60 (647 – 750) – 1,67 (664 – 750)] v}/V·L

dove i numeri in parentesi indicano le assorbanze degli estratti alle corrispettive lunghezze d'onda.
Per la descrizione di v, V e L si rimanda al Capitolo 8.

9. Qualità del dato

L'accuratezza delle concentrazione dei pigmenti calcolata con il metodo spettrofotometrico non è uniforme per tutte le potenziali miscele di clorofilla *a* e feofitina *a* che possono caratterizzare il campione. Errori variabili sono anche quelli di natura algebrica derivanti dall'applicazione delle citate equazioni.
Un estratto di clorofilla pura in acetone 90% riduce l'assorbanza a 665 nm di 1,7 quando acidificato. Campioni contenenti 50% clorofilla *a* e 50% di feofitina *a* su base molare sono caratterizzati da un rapporto di 1,35. Per una semplice propagazione di errori strumentali nella lettura di estratti prima e dopo acidificazione è stato osservato che errori sono stati commessi nel calcolo dei feopigmenti quando questi costituiscono una piccola frazione del totale (clorofilla+feopigmenti) e cioè quando il rapporto delle assorbanze prima e dopo acidificazione supera 1,35. In questo caso per il calcolo delle clorofille si consiglia di applicare la procedura descritta nel Paragrafo (8.1). Egualmente, errori possono essere commessi quando il rapporto cade al di sotto di 1,35, cioè quando la clorofilla rappresenta una piccola frazione del totale. Quindi è raccomandata particolare cautela nel considerare concentrazioni di feopigmenti o clorofilla in campioni che mostrano tali caratteristiche.
L'acidificazione dell'estratto trasforma stechiometricamente i pigmenti su base molare mentre Lorenzen formula le equazioni in funzione dei pesi specifici per mantenere uniforme l'unità di misura con i coefficienti di estinzione spesso dati in unità per peso specifico. La clorofilla *a* e la feofitina *a* sono caratterizzati da una differenza del 3% nel peso molecolare (893 e 869) e quindi l'errore di trasformazione da massa a mole è considerato trascurabile. Di conseguenza è trascurabile l'errore nel calcolo della clorofilla e dei feopigmenti nel caso in cui tutti i prodotti di degradazione siano costituiti da sola feofitina *a*. Il calcolo dei feopigmenti può invece essere sovrastimato di un fattore 1,5 quando il campione è caratterizzato da una cospicua presenza di feoforbide *a* poiché è spettralmente vicino alla feofitina *a* ma è caratterizzato da un peso molecolare 1,51 volte inferiore a quello della clorofilla *a*. Inoltre tutta la clorofilla *b*, se presente nel campione, è egualmente degradata a feofitina *a* e quindi erroneamente espressa come componente dei feopigmenti.
In una miscela di clorofille *a, b* e *c* la migliore stima è effettuata tramite le equazioni descritte nel Paragrafo (8.2), i cui coefficienti di estinzione assicurano una elevata accuratezza, con errori inferiori all'1% per la clorofilla *a* e *b*, e pari al 24% per la clorofilla *c*. Tali equazioni non tengono però conto delle eventuali interferenze dovute ai feopigmenti.

BIBLIOGRAFIA

ABAYCHI J.K. & RILEY J.P. (1979): "The determination of phytoplankton pigments by high performance liquid chromatography" *Anal.Chim.Acta*, **107**, 1-11.

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard methods for the examination of water and wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA).

HOLM–HANSEN O., LORENZEN C.J., HOLMES R.W. & STRIKLAND J.D.H. (1965): "Fluorimetric determination of chlorophyll", *J.Cons.Perma.Int.Explor.Mer.*, **30**, 3-15.

JEFFREY S.W. & HUMPHREY G.F. (1975): "New spectrophotometric equations for determining chlorophylls *a*, *b*, c_1, and c_2 in higher plants, algae and natural phytoplankton", *Biochem. Physiol. Plant. Pflanzen.*, **164**, 191-194.

LORENZEN C.J. (1966): "A method for continuous measurements of *in vivo* chlorophyll concentration", *Deep-Sea Res.*, **13**, 223-227.

LORENZEN C.J. (1967): "Determination of chlorophyll and phaeopigments: spectrophotometric equations", *Limnol. Oceanogr.*, **12**, 343-346.

LORENZEN C.J. & JEFFREY S.W. (1980): "*Determination of chlorophyll in seawater*", UNESCO. Technical papers in Marine Sciences, No.**35**, 21pp**.**

MOED J.R. & HALLEGRAEFF G.M. (1978): "Some problems in the estimation of chlorophyll-*a* and phaeopigments from pre- and post-acidification: spectrophotometric measurements", *Int. Rev. ges. Hydrobiol.*, **63**, 787-800.

PARSON T.R., TAKAHASHI M. & HARGRAVE B. (1977): "*Biological oceanographic processes* ", II Edition, Pergamon Press, Oxford, U.K.

RIEMANN B. (1978): "Carotenoid interference in the spectrophotometric determination of chlorophyll degradation products from natural populations of phytoplankton", *Limnol. Oceanogr.*, **23**, 1059-1066.

SCOR-UNESCO (1997): "*Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*" Jeffrey S.W., Mantoura R.F.C., Wright S.W., (eds.), UNESCO, Monographs on Oceanographic Methodology, **10**, Paris, 661pp.

WHO (1982): "*Examination of water for pollution control*", M.J. Suess (ed.), (Oxford. Pergamon Press) **3,** 200pp.

YENTSCH C.S. & MENZEL D.W. (1963): "A method for the determination of phytoplankton chlorophyll and pheophytin by fluorescence", *Deep Sea Res.*, **10**, 221-231.

9030. Determinazione dell'Adenosintrifosfato (ATP)

Introduzione

La misura dell'ATP è utilizzata come indicatore di biomassa totale in ambienti acquatici in quanto è presente in tutti gli organismi, sia autotrofi che eterotrofi, come molecola indispensabile al sistema energetico cellulare. Questa tecnica, proposta nel 1966 da Holm-Hansen e Booth, è stata largamente utilizzata in quanto rappresenta una stima affidabile di biomassa vivente. Gli autori hanno infatti misurato una rapida idrolisi della molecola dopo la morte della cellula con una perdita di ATP pari al 50% dopo 5 minuti e al 65% dopo venti minuti.
Il rapporto tra ATP e biomassa varia tra specie e specie, tuttavia nell'ambito della stessa specie rimane sufficientemente costante consentendo stime attendibili di biomassa. Tale rapporto può subire variazioni più rilevanti nel caso di stress fisiologici. Da misure di ATP è possibile stimare la biomassa totale planctonica considerando un contenuto di 2,4 µg ATP/mg di peso secco di sostanza organica.
Per la misura dell'ATP sono proposte in letteratura varie metodologie che differiscono essenzialmente per le diverse modalità con cui viene effettuata l'estrazione. Il metodo proposto nel seguito è stato preferito, anche rispetto a quello più frequentemente utilizzato introdotto da Holm-Hansen e Booth, per le ottime caratteristiche di resa e per l'estrema semplicità che ne permette l'applicazione anche in indagini di campo.

1. Principio del metodo

Il campione è raccolto su filtro e l'ATP estratto dalle cellule con dimetilsolfossido (DMSO). Quando l'ATP è messo in presenza del complesso enzimatico luciferina-luciferasi, estratto dall'addome di lucciola (*Photinus piralys*), avviene una rapida emissione di fotoni la cui intensità decade nel tempo esponenzialmente. Poiché per ogni fotone di luce emesso una molecola di ATP viene idrolizzata, l'intensità della luce emessa è direttamente proporzionale all'ATP contenuto nell'estratto del campione. La reazione enzimatica è così schematizzata:

$$E + LH_2 + ATP \overset{Mg^{2+}}{\rightleftharpoons} E \cdot LH_2 \cdot AMP + PP$$

$$E \cdot LH_2 \cdot AMP \quad O_2 \rightarrow E \quad \text{ossiluciferina} \quad CO_2 \quad AMP \quad \textit{luce}$$

dove:

E = luciferasi
LH = luciferina
$E{\cdot}LH_2{\cdot}AMP$ =complesso luciferiladenilato
PP = pirofosfato
AMP = adenosin-monofosfato

L'emissione luminosa è misurata tramite un luminometro. Dalla comparazione tra le letture del campione e quelle ottenute da soluzioni a concentrazione nota di ATP si risale alla concentrazione di quest'ultimo nel campione in esame.

2. Campo di applicazione

Il limite di rivelabilità dipende dal volume di acqua filtrata e dal tipo di strumento usato. In genere in base alle diverse caratteristiche del campione si consigliano 250-500 mL per acque eutrofiche o costiere, 1000 mL per acque oligotrofiche e 2000 mL per acque di profondità. Con la procedura esposta è possibile rivelare 0,20 µg/L di ATP come concentrazione minima nell'estratto, con probabilità 95% di ottenere un risultato diverso dal valore zero. Per concentrazioni comprese tra 0,70 e 700 µg/L la risposta è lineare (r = 0,999; n = 5).

3. Interferenze e cause di errore

Il tempo di trasformazione ("turnover") dell'ATP è estremamente rapido e molte sono le cause che possono alterarne il contenuto cellulare, tra cui l'esposizione alla luce diretta del campione (specialmente in organismi fotosintetici), le variazioni di ossigeno o di temperatura, il congelamento, la centrifugazione o una inaccurata filtrazione. Il tempo che intercorre tra il prelievo del campione e l'estrazione deve essere ridotto al minimo per evitare che gli enzimi idrolitici intracellulari (ATPasi, adenilatochinasi, fosfatasi) alterino le molecole di ATP.
In campioni derivanti da ambienti iperalini la biomassa potrebbe essere sovrastimata in quanto in queste particolari condizioni l'ATP persiste dopo la morte della cellula.
La variazione della forza ionica del mezzo influenza negativamente sia la stabilità dell'estratto che l'emissione luminosa e quest'ultima, essendo il prodotto di una reazione enzimatica, è influenzata anche da variazioni di temperatura.
I metalli pesanti o gli ioni alcalino-terrosi eventualmente presenti nei campioni naturali inibiscono la reazione di bioluminescenza. Alcuni di questi inconvenienti vengono ridotti nel corso delle operazioni analitiche tramite l'uso di DMSO, che inibisce le attività degli enzimi idrolitici sopracitati e di EDTA che ha capacità complessanti nei confronti di ioni alcalino-terrosi (ad esempio Ca^{2+}) e alcuni metalli pesanti.

4. Campionamento e conservazione del campione

Le bottiglie utilizzate per il prelievo sono del tipo comunemente usato nella pratica limnologica ed oceanografica.
La vetreria, unitamente alle bottiglie di prelievo, deve essere accuratamente pulita e lavata in acqua bidistillata e conservata asciutta. Si raccomanda di curare tale procedura specialmente per campionamenti in zone oligotrofiche e afotiche ove la quantità di biomassa presente è particolarmente ridotta.
Immediatamente dopo il prelievo, il campione è filtrato attraverso un retino (5.2) per eliminare lo zooplancton.
L'estrazione deve essere effettuata al più presto. L'estratto tamponato può essere conservato per qualche ora in frigorifero o per qualche mese a –20°C.

5. Apparecchiature

5.1 Normale attrezzatura da laboratorio

5.2 Accessori per filtrazione: pompa, manometro, beute da vuoto in Pirex con supporto per filtri, filtri a membrana (diametro 47 mm, porosità 0,45 µm), pinzette a punte piatte, retino da zooplancton con maglie di 200-250 µm.

5.3 Vetreria: oltre alla normale vetreria da laboratorio è necessario disporre di beute da 25 mL a collo largo con tappo, accuratamente lavate in acqua distillata e conservate asciutte.

5.4 Centrifuga

5.5 *Cuvette* monouso per la reazione enzimatica.

5.6 *Luminometro* collegato ad un registratore.

6. Reattivi

Tutti i reattivi sono di grado analitico e l'acqua bidistillata.

6.1 Soluzione tampone

Sciogliere in circa 800 mL di acqua bidistillata 2,09 g di acido 3-morfolinpropansolfonico (MOPS, 10 mM) e 0,74 g di acido etilendiaminotetracetico, sale disodico (EDTA, 2 mM). Correggere il pH a 7,40 con una soluzione acquosa di NaOH, 100 mM. Portare il volume a 1000 mL avendo cura di controllare il pH finale. Conservare le soluzioni in una bottiglia per reagenti alla temperatura di +4°C.

6.2 Dimetilsolfossido (DMSO, d=1,10)

6.3 Complesso enzimatico luciferina-luciferasi

Per migliorare il limite di rivelabilità della misura dell'ATP nell'estratto è indispensabile usare un prodotto di alta qualità. L'estratto commerciale di addome di lucciola, conservato a -20°C, è reidratato in un volume di acqua bidistillata secondo le istruzioni del produttore. La sospensione è tenuta un'ora a temperatura ambiente e centrifugata per la rimozione del particolato. Il supernatante è trasferito in una provetta e mantenuto al buio a temperatura ambiente per 2-3 ore. Il preparato deve essere utilizzato subito dopo perché non può essere conservato.

6.4 Soluzione di riferimento di ATP

Sciogliere 11,9 mg di adenosin-5'-trifosfato, sale bisodico triidrato ($C_{10}H_{14}N_5O_{13}P_3Na_2 \cdot 3H_2O$, P.M. 605,2) corrispondente a 10 mg di acido adenosintrifosforico ($C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3$, P.M. 507,2) in 1000 mL di acqua bidistillata. Diluire 1 mL in 100 mL di soluzione tampone (6.1) (0,2 mL = 0,02 µg di ATP). Quest'ultima soluzione, se non usata immediatamente, può essere conservata a –20°C per qualche mese.

7. Procedimento

7.1 Preparazione del campione

Predisporre tre beute (del tipo descritto nel Paragrafo 5.3) per ogni campione e introdurre in ciascuna 1,8 mL di DMSO.
Filtrare il campione attraverso il retino da zooplancton e successivamente attraverso l'apparato di filtrazione descritto al Paragrafo (5.2) sul cui setto poroso è stato posto il filtro a membrana prelevato con una pinzetta. Durante l'aspirazione la pressione deve essere mantenuta intorno ai 100 mmHg e interrotta un momento prima che l'ultimo strato di acqua passi attraverso il filtro.

7.2 Estrazione dell'ATP

Recuperare il filtro con le apposite pinze e introdurlo rapidamente in una beuta contenente il DMSO. Il tempo che intercorre tra la filtrazione e l'estrazione deve essere il minimo indispensabile, tenendo conto che la distruzione dell'ATP inizia entro 15 secondi dall'essiccazione del filtro.

Agitare dolcemente per 5 minuti ciascuna beuta e quindi aggiungere 10 mL di soluzione tampone (6.1).

7.3 Misura dell'emissione luminosa

Prelevare 0,2 mL di estratto a temperatura ambiente, introdurli successivamente nella cuvetta del luminometro e quindi nella camera di lettura. Iniettare vigorosamente 0,2 mL di enzima (6.3) nell'estratto. Registrare più di una emissione luminosa per ogni campione; per la determinazione del bianco, dopo aver introdotto 1,8 mL di DMSO in una beuta, seguire il procedimento descritto al Paragrafo (7.2) utilizzando un filtro pulito ed evitando il contatto con le dita.

7.4 Taratura

Effettuare una serie di diluizioni della soluzione di riferimento di ATP (6.4) fino ad ottenere letture prossime al campione. Leggere contro un bianco costituito da 0,2 mL di tampone (6.1). Il fattore di taratura si ricava dalla seguente espressione:

$$F_s = \frac{C}{L_{ss}}$$

dove:

F_s = fattore di taratura alla scala di lettura s;
C = concentrazione (µg/mL) di ATP della soluzione di riferimento;
L_{ss} = lettura media dell'emissione luminosa della soluzione di riferimento alla scala di lettura s corretta per il bianco.

8. Calcoli

Calcolare la concentrazione di ATP nel modo seguente:

$$\text{ATP } (\mu g/L) = \frac{L_{cs} \cdot V_e \cdot F_s}{V_c}$$

dove:

L_{cs} = lettura media dell'emissione luminosa del campione alla scala di lettura s corretta per il bianco;
V_e = volume (mL) dell'estratto (11,8 mL);
F_s = fattore di taratura;
V_c = volume (L) di campione filtrato.

9. Qualità del dato

In campioni naturali di acqua di mare con concentrazione di ATP intorno a 0,30 µg/L si è ottenuto un coefficiente di variazione, [CV(%)= scarto tipo/valore medio)·100], pari al 4% (n= 10).

BIBLIOGRAFIA

APHA, AWWA, WEF (1998): "*Standard methods for the examination of water and wastewater*", XX Ed., (Washington, APHA).

HENDZEL L.L. & HEALEY F.P. (1984): "Extraction of algal ATP and interpretation of measurements", *Can. J. Fish. Aq. Sci.*, **41**, 1601-1608.

HOLM-HANSEN O. & BOOTH C.R. (1966): "The measurement of Adenosine Triphosphate in the ocean and its ecological significance", *Limnol. Ocean.*, **11**, 510-519.

JAKUBCZAK E., LECLERCH H. & SECRETIN P. (1980): "Mésure de l'ATP bacterien par bioluminescence: étude critique des méthodes d'extraction", *Ann. Biol. Clin.*, **38**, 297-304.

McELROY W.D., SELIGER H.H. & WHITE E.H. (1969): "Mechanism of bioluminescence, chemioluminescence and enzyme function in the oxidation of firefly luciferin", *Photochem. Photobiol.*, **10**, 153-170.

RUDD J.M. & HAMILTON R.D. (1973): "Measurement of Adenosine Triphosphate (ATP) in two precambrian shield lakes of Northwestern Ontario", *J. Fish. Res. Board Can.*, **41**, 1601-1608.

TUOVILA B.J., DOBBS F.C., LA ROCK P.A. & SIEGEL B.Z. (1987): "Preservation of ATP in hypersaline environments", *Appl. Environ. Microb.*, **53**, 2749-2753.

ZOPPINI A., PAGNOTTA R. & PUDDU A. (1988): "Misure di ATP cellulare per la stima delle biomasse di microrganismi acquatici: confronto di metodologie", *Inquinamento*, **10**, 60-63.

9040. Conta diretta dell'abbondanza microbica (DAPI)

Introduzione

La conta diretta delle cellule al microscopio ad epifluorescenza permette la misura delle abbondanze cellulari con affidabilità e relativa velocità e rappresenta uno strumento necessario per studiare la dinamica delle popolazioni batterioplanctoniche. Tale tecnica consente inoltre di distinguere facilmente le cellule microbiche dal detrito inerte. Le abbondanze cellulari così ottenute sono generalmente superiori a quelle stimate tramite diversi metodi indiretti (conta su piastra e MPN), affetti da errori causati dai fenomeni legati alla vitalità cellulare (la selettività del mezzo di coltura, le diverse velocità di crescita degli organismi e l'aggregazione).
Dall'abbondanza così ottenuta è possibile stimare la biomassa, espressa in termini di carbonio, utilizzando fattori di conversione tra cui il più utilizzato attribuisce 20 fg C per cellula. Questa elaborazione, pur fornendo in prima approssimazione una stima di biomassa, non tiene conto del volume delle singole cellule che può variare significativamente in diverse condizioni ambientali. Quindi stime più accurate sono ottenibili dalla misura del biovolume cellulare determinato attraverso il metodo fotografico associato all'uso di un modello di conversione.

1. Principio del metodo

Le cellule colorate con un fluorocromo specifico e raccolte su un filtro a porosità 0,2 μm sono successivamente contate attraverso l'osservazione diretta al microscopio ad epifluorescenza. Il fluorocromo, legato al DNA cellulare, produce fluorescenza in seguito all'eccitazione con luce di appropriate lunghezze d'onda. Le cellule di dimensioni inferiori al limite di risoluzione del microscopio ottico (generalmente <1 μm) possono essere così visualizzate. L'operatore potrà quindi agevolmente distinguere, dal fondo scuro del filtro, le cellule colorate in blu e il materiale di origine detritica colorato in giallo.
Il campione colorato e raccolto su filtro comprende tutti gli organismi di dimensioni superiori a 0,2 μm, includendo sia organismi a metabolismo autotrofo che eterotrofo. Quindi, sebbene i procarioti acquatici morfologicamente siano riconducibili a poche e semplici forme (bastoncelli, sfere e filamenti), il loro metabolismo si differenzia in maniera significativa. La stima delle abbondanze cellulari tramite conta diretta su filtro si intende totale, in quanto non permette il riconoscimento delle cellule su base tassonomica o metabolica né fornisce indicazioni sulla vitalità delle cellule.

2. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile ad acque naturali (superficiali o sotterranee).
L'intervallo di abbondanze batteriche misurabile dipende dal volume di acqua filtrata. Il volume varia a seconda delle caratteristiche trofiche delle acque o della profondità di prelievo (vedi Capitolo 4 e Paragrafo 7.2).

3. Interferenze e cause di errore

Diminuzioni significative di cellule nei campioni sono causate da una cattiva conservazione

del campione o da fenomeni di aggregazione o adesione delle cellule al materiale in sospensione di diversa origine (neve marina, presenza di materiale particolato di origine fecale o detritica). Questi fenomeni sono causa sia di una irregolare deposizione delle cellule sul filtro che di una stratificazione delle stesse che rendono inadeguato il metodo di conteggio esposto. Poiché questi casi non sono frequenti si rimanda alla letteratura specializzata per ottenere informazioni sulla corretta procedura da seguire per ottenere un buon preparato.
Particolari cure devono essere riservate alla manipolazione del campione al fine di evitare contaminazioni.
La specificità del fluorocromo per il DNA impedisce la discriminazione all'interno del campione tra cellule autotrofe ed eterotrofe. Nonostante questo limite, la conta delle cellule colorate con il DAPI (4',6–Diamidino-2-fenilindolo diidrocloruro) è generalmente riferibile a cellule eterotrofe, in grado cioè di ossidare i substrati organici, poiché il loro contributo numerico generalmente domina nel batterioplancton. È possibile però identificare le cellule a metabolismo autotrofo sfruttando la proprietà di autofluorescenza dei pigmenti fotosintetici e sottrarre la loro abbondanza dal totale.

4. Campionamento e conservazione del campione

Il campionamento può essere effettuato con le normali procedure, utilizzando bottiglie a chiusura comandata del tipo Niskin.
Il volume di campione necessario per l'analisi varia tra 0,5 mL, sufficienti per acque ad elevata trofia, a più di 20 mL per acque oligotrofiche o di profondità. Il volume prescelto deve infatti garantire in fase di osservazione al microscopio un'adeguata densità cellulare (da 20 a 50 cellule per campo). In fase di prelievo è necessario prevedere un volume di campione sufficiente per consentire almeno una replica del preparato.
Entro 3 ore dal prelievo il campione deve essere fissato con formalina (concentrazione finale 2%) precedentemente filtrata su filtri a porosità 0,2 µm. Dopo l'aggiunta il campione va agitato energicamente e conservato al buio e in frigorifero. I campioni devono essere filtrati entro 24 ore dal prelievo e montati su vetrini da microscopio. I preparati possono così essere conservati a –20°C, senza subire alterazioni, fino ad un massimo di 70 giorni.

5. Apparecchiature

5.1 Normale attrezzatura da laboratorio
Tutta la vetreria che entra in contatto con il campione deve essere accuratamente lavata e sterile.

5.2 Provette sterili da 20 mL e da 2 mL a tenuta.

5.3 Apparato di filtrazione: completo di pompa aspirante con manometro, beuta da vuoto, portafiltro e imbuto da filtrazione (diametro 25 mm), pinze a molla per fissare l'imbuto alla base e pinzetta per filtri.

5.4 Siringa completa di supporto per filtri *e filtri sterili* a porosità 0,2 µm.

5.5 Filtri a membrana: filtri di supporto (porosità 0,45 µm, diametro 25 mm), filtri neri in policarbonato (porosità 0,2 µm, diametro 25 mm). I filtri in policarbonato si trovano in commercio già colorati e con un basso livello di fluorescenza. In alternativa possono essere utilizzati filtri bianchi da colorare successivamente con Irgalan black (ad 1 litro di acqua distillata filtrata su 0,2 µm aggiungere 2 g di Irgalan black, 20 mL di acido acetico, 5,7 mL di formalina al 37%).

5.6 Micropipette e puntali sterili

5.7 *Vetrini da microscopio* completi di coprioggetti.

5.8 *Olio da immersione* per microscopia non fluorescente.

5.9 *Congelatore e frigorifero* per la conservazione dei campioni e delle soluzioni.

5.10 *Autoclave*

5.11 *Guanti monouso*

5.12 *Microscopio ad epifluorescenza*, dotato di lampada a vapori di mercurio (100 W), combinazione di filtri (eccitazione 340-380 nm, lamina dicromatica 400 nm, filtro di sbarramento 425 nm), oculari 10X di cui uno dotato di reticolo quadrettato, micrometro oggetto, obiettivo ad immersione 100X.

6. Reattivi

6.1 *Formaldeide al 37%* filtrata attraverso fitri da 0,2 µm.

Per campioni di acqua dolce è necessario utilizzare formaldeide tamponata a pH=7,5, ottenuta aggiungendo, con pipetta Pasteur, alla soluzione (6.2) alcune gocce di NaOH 2 M.

6.2 *Soluzione di 4'6-diamidino-2-fenilindolo (DAPI, 0,5 mg/mL)*

Tutte le operazioni devono essere condotte al riparo dalla luce per evitare il decadimento della fluorescenza del prodotto. Sciogliere 10 mg di sale in 20 mL di acqua distillata. Porre la soluzione in una provetta e agitare fino alla completa solubilizzazione del sale. Utilizzando una siringa e relativo portafiltro sterile filtrare la soluzione su un filtro a porosità 0,2 µm. Distribuire il filtrato in provette sterili da 2 mL con tappo a tenuta. La soluzione conservata a –20°C mantiene inalterate a lungo le proprie caratteristiche. Ogni preparazione va osservata al microscopio prima della conservazione per verificarne l'effettiva sterilità.

Nota: *il DAPI è un composto mutageno per l'elevata specificità di legame nei confronti del DNA. Si consiglia pertanto di evitare accuratamente il contatto diretto e l'inalazione.*

7. Procedimento

7.1 *Colorazione e filtrazione*

Predisporre l'apparato di filtrazione ponendo con le apposite pinze il filtro nero da 0,2 µm sovrapposto a quello di supporto da 0,45 µm. Il filtro di supporto può essere utilizzato per numerose preparazioni. Evitare accuratamente il contatto delle dita con i filtri. Fissare l'imbuto da filtrazione alla base con le pinze a molla. Agitare energicamente il campione, introdurre un'aliquota nell'imbuto da filtrazione e aggiungere 2 µL di soluzione DAPI per ogni mL di campione da filtrare. Attendere 4 minuti, mantenendo il campione al buio. Il campione così colorato è stabile per ore. Procedere alla filtrazione esercitando una pressione di vuoto non superiore a 80 mm Hg. Non lasciare essiccare completamente il filtro per evitare la compromissione delle cellule.

7.2 *Preparazione del vetrino*

Poggiare il filtro al centro del vetrino portaoggetto su cui è stata precedentemente posta una piccola goccia di olio (5.8). Porre un'altra goccia di olio sulla superficie del filtro e montare il coprioggetti esercitando una leggera pressione fino a che l'olio abbia ricoperto il filtro. L'u-

so di una quantità eccessiva di olio determina la fuoriuscita delle cellule dal vetrino e la distribuzione delle cellule su più piani focali. Nel caso in cui il preparato debba essere conservato si consiglia di verificare al microscopio la qualità dell'immagine, controllando, in particolare, che l'immagine giaccia su un solo piano focale e che le cellule siano uniformemente distribuite sul filtro.

7.3 Osservazione al microscopio

Osservare da 20 a 40 campi distribuiti con criterio di casualità su tutta l'area del filtro e contare un minimo di 600 cellule per filtro. Un'appropriata densità cellulare sul filtro è data da un numero di cellule approssimativamente compreso tra 20 e 50 per campo. Se le cellule sono troppo numerose è necessario ridurre il volume da filtrare. È utile tenere presente che la fluorescenza delle cellule decade con il tempo durante l'osservazione.

8. Calcoli

Il numero di cellule batteriche nel campione può essere così calcolato:

$$L = \frac{X_n}{A_c} \frac{A_b}{V_c}$$

dove:

X_n = numero totale di cellule/numero dei campi esplorati (ai fini del calcolo un campo senza cellule va considerato come un campo esplorato);
A_b = area (mm^2) del filtro su cui sono state raccolte le cellule;
A_c = area (mm^2) del reticolo quadrettato, ottenuta dalla misurazione con il micrometro oggetto;
V_c = volume (mL) di campione filtrato/1,06 (*).

9. Qualità del dato

Seguendo le indicazioni fornite nel metodo la precisione della misura è di ±10% al 95% di intervallo di confidenza. Per una migliore precisione è raccomandabile la lettura di due preparati per ogni campione. Se non è richiesta una precisione elevata è sufficiente contare un totale di 200 cellule per filtro.

BIBLIOGRAFIA

HOBBIE J.E., DALEY R. & JASPER S. (1977): "Use of Nuclepore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy", *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 1225-1228.

LEE S. & FUHRMAN J.A. (1987): "Relationship between biovolume and biomass of naturally derived marine bacterioplankton", *Appl. Environ. Microbiol.*, **53,** (6), 1298-1303

NORLAND S., HELDAL M. & TUMYR O. (1987): "On the relation between dry matter and volume of bacteria", *Microb. Ecol.*, **13**, 95-101.

PORTER G.K. & FEIG S.Y. (1980): "The use of DAPI for identifying and counting aquatic mi-

(*) fattore di correzione per la presenza nel campione del fissativo, alle condizioni sopraesposte.

croflora", *Limnol. Oceanagr.*, **25** (5), 943-948.

SHERR B., SHERR E. & DEL GIORGIO P. (2001): "Enumeration of total and highly active bacteria" In: *Methods in Microbiology. Marine Microbiology*, H. Paul ed. Academic Press, London, UK, **30**, 129-159.

TURLEY C.M. & HUGHES D.J. (1994): "The effect of storage temperature on the enumeration of epifluorescence-detectable bacterial cells in preserved sea-water samples", *J. mar. biol. Ass. U.K.*, **74**, 259-262.

VELJI M.I. & ALBRIGHT L.J. (1993): "Improved sample preparation for enumeration of aggregated aquatic substrate bacteria", In: *Handbook of Methods in Aquatic Microbial Ecology.* P.F. Kemp, B.F. Sherr, E.B. Sherr, J.J. Cole Eds., Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, 139-142.